CITOLOGIA DA SECREÇÃO HOLÓCRINA

JOSÉ MESQUITA-GUIMARÃES

PORTO — 1974

CITOLOGIA DA SECREÇÃO HOLÓCRINA

Tip. SOCIEDADE de PAPELARIA, Lda.
Rua da Boavista, 375 — P O R T O

JOSÉ MANUEL DA COSTA MESQUITA GUIMARÃES

CITOLOGIA DA SECREÇÃO HOLÓCRINA

ESTUDO EFECTUADO NA GLÂNDULA SEBÁCEA PREPUCIAL DO RATO

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

PORTO
1974

Publicação subsidiada pelo Instituto de Alta Cultura

À FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Art.º 48.º, § 3.º — A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(*Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto*, 29 de Janeiro de 1931. — Decreto n.º 19.337).

AO EXCELENTÍSSIMO SENHOR PROFESSOR

DOUTOR

ANTÓNIO COIMBRA

A meus Pais
A minha Mulher
A meus Filhos

PREFÁCIO

Para quem como nós vive no quotidiano os problemas da patologia clínica da pele, afigura-se fundamental o conhecimento da sua estrutura e funcionamento normais. No entanto, apenas nos foi possível debruçarmo-nos sobre estes temas quando iniciámos a nossa actividade de assistente no Serviço de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina do Porto. Só então passámos a dispor de condições favoráveis ao estudo e à reflexão crítica necessárias. Entretanto, o clima de intenso labor científico que nos envolvia estimulou-nos a dar os primeiros passos na senda árdua, mas aliciante, da investigação. Dada a formação de dermatologista de que já dispúnhamos, decidimos investigar a citologia fina das glândulas sebáceas, de tão grande importância na fisiologia e patologia cutâneas.

Durante a elaboração desta dissertação, publicámos, em colaboração, parte dos resultados obtidos em duas revistas de língua inglesa (J. Ultrastruct. Res., 47 : *242, 1974 e* Histochem. J., *em publicação). Em ambos os trabalhos, a nossa contribuição consistiu na colheita dos resultados e em parte da redacção do texto (Decreto-lei n.º 388/70, Art. 8.º, parágrafo 2).*

Ao Sr. Professor António Coimbra, director do Serviço de Histologia e Embriologia e nosso orientador, patenteamos profunda gratidão e preito de homenagem pelo benefício do seu esclarecido conselho, pela generosidade do seu valioso apoio e pelo exemplo de doação aos colaboradores e alunos.

Ao Sr. Professor Manuel da Silva Pinto, director do Serviço quando nele encetámos a actividade docente, estamos muito gratos pelo seu estímulo e pela amizade com que sempre nos tem honrado. Ao Sr. Professor Manuel Miranda Magalhães, agradecemos o amável auxílio que nos concedeu no esclarecimento de dificuldades e a valiosa crítica feita ao nosso trabalho. Ao Sr. Dr. Manuel Teixeira da Silva, amigo desde a primeira hora, o nosso muito obrigado pelos inestimáveis conselhos que tão frequentemente nos prodigalizou.

Estamos também muito gratos à Sr.ª D. Alice Guimarães pela elevada competência e dedicação demonstradas na parte laboratorial deste trabalho, assim como à Sr.ª D. Maria Amélia Sousa e aos srs. José Novo e Fernando Rodrigues pela sua colaboração zelosa, desinteressada e amiga. À Sr.ª Dr.ª Maria Eunice Sampaio e às Sr.as D. Maria Alice Neves e D. Maria Teresa do Nascimento, manifestamos o nosso reconhecimento pela boa vontade e maneira modelar como elaboraram as provas fotográficas. Às Sr.as D. Maria Teresa Laranjeira e D. Maria Irene Folhadela, estamos deveras reconhecidos pela forma proficiente e incansável como dactilografaram o manuscrito. Ao discente Sr. Joaquim Ferreira Seabra, agradecemos a cooperação que nos deu na medição dos diâmetros das gotículas lipídicas e dos grânulos perinucleares e na determinação da concentração destes.

Finalmente, agradecemos à Fundação Calouste Gulbenkian a amável oferta dos ratos que utilizámos e, à Schering Lusitana, Lda., o fornecimento do propionato de testosterona e do benzoato de estradiol.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUÇÃO

Biologia das glândulas sebáceas em geral 1

As glândulas sebáceas prepuciais do rato 8

MATERIAIS E MÉTODOS

Material normal

Microscopia de luz 13

Microscopia electrónica 18

Citoquímica ultrastrutural 19

Material experimental 22

RESULTADOS

Arquitectura geral das glândulas prepuciais do rato ... 25

Citologia do parênquina glandular 32

Citoquímica das células secretoras

Componentes do material secretório 60

Actividades enzimáticas 77

Efeitos da testosterona, estradiol e orquidectomia na citologia e citoquímica das células secretoras 82

Citologia dos canais excretores 94

Células claras 113

DISCUSSÃO

Renovação das células secretoras 119

Diferenciação das células secretoras 121

Involução celular — A desagregação holócrina 131

Secreção lipídica

Citoquímica 133

Efeitos hormonais 136

Secreção proteica

Citoquímica 139

Enzimas 141

Efeitos hormonais 143

Canais excretores. Seu papel na formação do sebo 144

Células claras 149

RESUMO E CONCLUSÕES 153

SUMMARY AND CONCLUSIONS 159

BIBLIOGRAFIA 163

INTRODUÇÃO

BIOLOGIA DAS GLÂNDULAS SEBÁCEAS EM GERAL

As glândulas sebáceas são, da mesma forma que os pêlos e as glândulas mamárias, estruturas celulares próprias dos mamíferos (Montagna, 1963 b), nos quais se apresentam disseminadas na pele e nas mucosas bucal e genital (Montagna, 1963 a, b; Miles, 1963; Hyman e Guiducci, 1963).

Compõem-se de uma ou mais unidades secretoras em forma de ácino e de canais excretores únicos ou ramificados. As variações de forma e tamanho que se observam em relação com a espécie animal (Schaffer, 1940; Montagna, 1963 b), o indivíduo (Beaver, 1960; Strauss *et al.*, 1962), a localização (Montagna, 1963 a, b; Strauss e Pochi, 1963), a idade (Pannese, 1954; Grandjean, 1959; Beaver, 1960; Freinkel, 1963; Strauss e Pochi, 1963) e o sexo (Pannese, 1954; Beaver, 1960; Martan, 1962; Freinkel, 1963; Takayasu e Adachi, 1970), incidem principalmente no número e volume dos ácinos e na complexidade da arborização canalicular. Por exemplo, as glândulas sebáceas da pele humana, pluriacinosas compostas, contrastam com as pequenas glândulas, uniacinosas simples, da pele do ratinho (Montagna, 1963 b). O mesmo se verifica, no homem, com as glândulas de Meibomius das pálpebras, pluriacinosas compostas, quando comparadas com as balano-prepuciais, acinosas simples

(Montagna, 1963 a). Mais desenvolvidas, porém, do que todas as outras, são as glândulas sebáceas prepuciais dos roedores (Schaffer, 1933, 1940), as inguinais do coelho (Oppel, 1904), as supracaudais das cobaias (Sprinz, 1912), as costovertebrais dos cricetos (Hamilton e Montagna, 1950), as perianais dos felídeos e dos canídeos (Montagna, 1963 b) e, sobretudo, as branquiais dos lémures (Montagna, 1962, 1963 b), todas macroscopicamente visíveis e apresentando parênquima multilobulado e rede ductular complexa.

As glândulas sebáceas estão geralmente unidas a folículos pilosos formando a clássica unidade pilosebácea. Contudo, nalgumas grandes glândulas da face do homem, os folículos sebáceos (Horner, 1846; Kligman e Shelley, 1958), abrem-se directamente na superfície cutânea. Por outro lado, as maiores glândulas sebáceas, como as prepuciais dos roedores, são habitualmente independentes dos pêlos.

As glândulas sebáceas são, como as sudoríparas, as mamárias, as salivares e as lacrimais, derivados epiteliais de origem ectodérmica (Duval, 1897). Formam-se a partir de gomos celulares massiços, que crescem e se aprofundam nos tecidos subjacentes, onde adquirem lume e se diferenciam (Duval, 1897; Serri e Huber, 1963).

A formação do sebo é um processo dinâmico de síntese e armazenamento de lípidos — lipogénese — que termina na desintegração celular — secreção holócrina. Assim, o sebo apresenta-se constituído pelos lípidos segregados pelas células acinosas e pelos restos do protoplasma das mesmas células. A sua composição química é mal conhecida, devido à dificuldade em colher o sebo em estado puro e, ainda, à falta de sensibilidade das técnicas disponíveis para a sua análise.

Os estudos do chamado *filme lipídico* da pele humana, efectuados por Nicolaides e Foster (1956), Haahti (1961) e Nicolaides *et al.* (1968), revelaram que os lípidos da superfície da pele dos adultos normais são uma mistura de ácidos gordos livres (20 a 35 p. 100), monoglicéridos (2 a 7 p. 100), diglicé-

ridos (5 a 13 p. 100), triglicéridos (20 a 40 p. 100), céridos e estéridos (22 a 25 p. 100), escaleno (7,5 a 17 p. 100), esteróis livres (1 a 9,5 p. 100) e parafina (0,5 a 1,9 p. 100). Adicionalmente, Bey (1963) observou 0,2 a 6,6 p. 100 de álcoois livres.

A análise dos extractos obtidos a partir de *glândulas sebáceas isoladas* por dissecção (Kellum, 1966) mostrou a presença dos mesmos componentes (Kellum, 1967; Peter *et al.*, 1970; Summerly e Woodbury, 1972; Kellum *et al.*, 1973), mas uma maior quantidade de triglicéridos e um menor teor em ácidos gordos livres e em mono e diglicéridos. Estas diferenças devem-se à hidrólise bacteriana efectuada durante o trajecto nos ductos glandulares ou já na superfície cutânea (Nicolaides e Wells, 1957; Strauss e Mescon, 1959; Scheimann *et al.*, 1960; Freinkel, 1968; Reisner *et al.*, 1968; Reisner e Puhvel, 1969; Freinkel e Shen, 1969; Kellum e Strangfeld, 1969; Kellum *et al.*, 1970; Marples *et al.*, 1971). Simultaneamente, haveria esterificação dos esteróis existentes nas células glandulares (Wilkinson, 1969; Kellum *et al.*, 1973). Quanto à parafina do filme lipídico supõe-se ter origem na contaminação exógena (Nicolaides, 1963). Chamamos a atenção para o facto de a epiderme contribuir para os lípidos da superfície apenas com colesterol (Boughton *et al.*, 1957; Reinertson e Wheatley, 1959), fosfolípidos (Hsia *et al.*, 1970; Summerly e Woodbury, 1972) e escassas quantidades de triglicéridos (Carruthers, 1964), escaleno (Nicolaides e Rothman, 1955; Nicolaides, 1965) e céridos (Nicolaides, 1965).

As vias metabólicas de síntese dos lípidos nas células das glândulas sebáceas não parecem diferir das das outras células que acumulam gordura (Nicolaides, 1963). O ião acetato tem sido considerado o precursor normal dos ácidos gordos, do escaleno e dos esteróis na pele humana (Nicolaides *et al.*, 1955), na do cão (Wheatley *et al.*, 1961), na do rato (Burgess e Wilson, 1963); Prottey *et al.*, 1972) e nas glândulas prepuciais do rato (Burgess e Wilson, 1963) e do ratinho (Sansone, 1968). Glândulas sebáceas isoladas da pele humana, incubadas em meio

contendo acetato-^{14}C, incorporaram 45 p. 100 da radioactividade nos triglicéridos, 21 p. 100 no escaleno, 17 p. 100 nos céridos, 7 p. 100 nos lípidos polares (incluindo fosfolípidos), 2 p. 100 nos ácidos gordos livres, 1,8 p. 100 nos diglicéridos e 1,5 p. 100 nos esteróis livres (Summerly e Woodbury, 1972). Em idênticas condições, a glicose-^{14}C marcou aquelas fracções lipídicas se bem que mais intensamente os triglicéridos (72 p. 100) e menos os céridos (1 p. 100) e o escaleno (0,3 p. 100) (Kellum *et al.*, 1973). Os trabalhos de Wheatley (1956), de Wheatley *et al.* (1961) e de Sansone (1968), mostraram que os ácidos aminados iso-leucina, leucina e valina são utilizados na síntese primária dos ácidos gordos ramificados. Para Sansone (1968) seria até habitual a reutilização dos metabolitos das proteínas na síntese lipídica. Contudo, Kellum *et al.* (1973) foram incapazes de marcar ácidos gordos ramificados incubando glândulas sebáceas isoladas da pele humana em meio contendo aqueles ácidos aminados. Finalmente, em glândulas sebáceas da pele do rato, Prottey *et al.* (1972) verificaram captação selectiva do ortofosfato-^{32}P pelos fosfolípidos e do ácido mevalónico-^{14}C pelo colesterol, pelo escaleno e pelo lanosterol. Apenas uma pequena parte do escaleno é convertido em esteróis (Nicolaides, 1963; Eidinoff *et al.*, 1954; Nicolaides e Rothman, 1955; Griesemer e Thomas, 1963; Peter *et al.*, 1970).

Com o advento da moderna biologia celular, alguns investigadores têm tentado determinar o papel dos diversos organelos na elaboração da secreção.

Ludford (1925) notou que havia diminuição do número das mitocôndrias durante a transformação sebácea. Todavia, Montagna (1955, 1963 a), Charles (1960), Ellis e Henrikson (1963), Ellis (1967) e Strauss e Matoltsy (1973) afirmaram manter-se inalterado o número das mitocôndrias, tendo Rogers (1957) e Ellis e Henrikson (1963) referido apenas diminuição do número dos grânulos intramitocondriais com o aumento da secreção sebácea. Rogers (1957), Dangelo e Munger (1964), Ozawa (1967) e Bell (1970, 1974 a, b) notaram contiguidade

entre as gotículas lipídicas e o retículo endoplásmico liso. Palay (1958), Hibbs (1962), Ellis e Henrikson (1963), Ellis (1967) e Strauss e Matoltsy (1973), sugeriram que o aparelho de Golgi fosse o centro onde os lípidos se agregam e que as membranas que envolvem as gotículas lipídicas fossem oriundas do Golgi e do retículo endoplásmico liso. Porém, para Charles (1960), nas glândulas sebáceas da pele humana, as gotículas lipídicas formar-se-iam directamente no hialoplasma e não no interior de membranas.

Durante a diferenciação sebácea, observou-se diminuição progressiva da basofilia citoplasmática (Montagna, 1956) e do número dos ribosomas livres e aderentes a membranas (Hibbs, 1962; Ellis e Henrikson, 1963; Ellis, 1967; Strauss e Matoltsy, 1973).

Finalmente, nas glândulas sebáceas cujas células contêm glicogénio — nas da pele do homem (Montagna, 1963 a; Montagna *et al.*, 1951, 1952; Hibbs, 1962; Ellis e Henrikson, 1963; Ellis, 1967; Strauss e Matoltsy, 1973), dos lémures e de alguns primatas superiores (Montagna, 1963 b; Bell, 1970) e nas inguinais do coelho (Henrikson, 1965) — a quantidade de glicogénio diminui com a diferenciação celular e com o aumento do número das gotículas lipídicas (Montagna *et al.*, 1951, 1952; Ellis e Henrikson, 1963; Henrikson, 1965; Ellis, 1967; Strauss e Matoltsy, 1973).

Pouco se sabe acerca das causas da desagregação holócrina das células sebáceas e sobre as alterações ultrastruturais que a definem. As observações de microscopia de luz deixavam entender que as células sebáceas, quando totalmente diferenciadas, se desagregariam devido a demasiada distensão da membrana celular (Duval, 1897; Lorincz e Stoughton, 1958). O colapso das células sebáceas resultaria também do esforço de síntese lipídica agravado pelo progressivo afastamento das fontes nutritivas. Recentemente, Brandes *et al.* (1965) e Rowden (1968), responsabilizaram os lisosomas pela lise das células sebáceas; observaram aumento do seu número e volume durante a matu-

ração sebácea e sugeriram que a destruição celular se faria após rotura da membrana lisosómica com libertação de fosfátase ácida (Brandes *et al.*, 1965) e de aril sulfátase (Rowden, 1968) no hialoplasma.

A actividade das glândulas sebáceas é regulada por factores endócrinos. Freinkel (1963) verificou mais intensa actividade nas glândulas prepuciais dos ratos machos do que nas das fêmeas. Numerosos autores observaram quer no homem (Hamilton, 1941; Rony e Zakon, 1943; Jarret, 1959; Smith, 1959; Strauss *et al.*, 1962; Strauss e Pochi, 1963), quer no animal de experiência (Korenchevsky e Dennison, 1934 b; Burdick e Gamon, 1941; Ebling, 1948, 1955, 1957 a, b; Montagna e Kennyon, 1949; Hamilton e Montagna, 1950; Haskin *et al.*, 1953; Lasher *et al.*, 1954, 1955; Beaver, 1960; Martan, 1962; Freinkel, 1963), que a testosterona produz hipertrofia das glândulas sebáceas e aumento da secreção do sebo. Ebling (1957 a) mostrou que estes efeitos resultavam do aumento do número e do volume das células sebáceas, da estimulação da actividade mitótica das células basais e do aumento do conteúdo lipídico das células em diferenciação. Em ratos machos castrados, Wilson (1963) e Burgess e Wilson (1963) referiram que a testosterona aumentava, respectivamente, a síntese dos esteróis e do escaleno e a dos ácidos gordos nas glândulas prepuciais a partir do acetato-2-^{14}C e do mevalonato-2-^{14}C. A testosterona é rapidamente metabolizada na pele e nas glândulas sebáceas em vários derivados androgénicos (Rongone, 1966 a, b; Bruchovsky e Wilson, 1968; Gomez e Hsia, 1968; Wilson e Walker, 1969; Bardin *et al.*, 1970; Bullock e Bardin, 1970, 1973; Flamigni *et al.*, 1970, 1971; Richardson e Axelrod, 1971; Sansone e Reisner, 1971; Adachi e Kano, 1972; Hodgins e Hay, 1973; Karunakaran *et al.*, 1973; Voigt e Hsia, 1973). Destes, a diidrotestosterona, a androstanediona, a androstenediona, a androsterona e a diidroepiandrosterona foram identificadas no filme lipídico da pele humana (Dubovyi, 1967; Oertel e Treiber, 1969; Karunakaran *et al.*, 1973). A diidrotestosterona, prova-

velmente o androgénio mais potente (Dorfman e Dorfman, 1962) e o que parece mais activo a nível celular (Bruchovsky e Wilson, 1968), é o metabolito predominante na pele humana (Gomez e Hsia, 1968; Sansone e Reisner, 1971; Jenkis e Ash, 1971) e nas glândulas prepuciais do rato (Bruchovsky e Wilson, 1968; Hodgins e Hay, 1973).

A 5 α-redútase e várias desidrogénases dos hidroxiesteróides, habitualmente consideradas intervenientes no metabolismo dos esteróides sexuais (Gomez e Hsia, 1968; Muir *et al.*, 1970), foram observadas nas glândulas sebáceas da pele humana (Baillie *et al.*, 1965, 1966; Voigt e Hsia, 1973), nas prepuciais do rato (Muir *et al.*, 1970; Richardson e Axelrod, 1971; Hodgins e Hay, 1973) e nas glândulas sebáceas do lábio da cobaia (Muir *et al.*, 1970). Adachi e Kano (1972), demonstraram a existência de receptores proteicos específicos da diidrotestosterona no citoplasma e no núcleo das células das glândulas sebáceas costovertebrais do criceto e sugeriram que a diidrotestosterona começaria por ligar-se ao receptor citoplasmático (7-8 S) sendo mais tarde transferida para o receptor nuclear (3-4 S). Segundo os trabalhos de Bruchovsky e Wilson (1968), Mainwaring *et al.* (1971) e Fang e Liao (1971), o complexo proteína-diidrotestosterona incorpora-se à cromatina onde se daria a estimulação da síntese do ARN. A acção da testosterona nas glândulas sebáceas da pele do rato parece requerer o efeito concomitante das hormonas hipofisárias (Ebling *et al.*, 1969, 1970 a, b).

No homem e no rato, a orquidectomia (Ebling, 1957 a, b, 1963; Beaver, 1960; Hamilton e Mestler, 1963; Strauss e Pochi, 1963; Sherins e Bardin, 1971) e a administração de estrogéneos (Hooker e Pfeiffer, 1943; Ebling 1948, 1963; Strauss *et al.*, 1962; Strauss e Pochi, 1963; Ebling e Skinner, 1967) reduzem a secreção sebácea. Sansone-Bazzano *et al.* (1972) verificaram, incubando glândulas prepuciais de ratos normais e orquidectomizados injectados com benzoato de estradiol em meio contendo testosterona-1,2 ^{3}H, que a orquidectomia aumentava a captação

da testosterona mas diminuía a sua conversão em diidrotestosterona, enquanto o estradiol diminuía quer a captação quer a conversão da testosterona. Finalmente, em glândulas sebáceas costovertebrais do criceto, Adachi e Kano (1972) observaram que a orquidectomia reduzia a quantidade dos receptores proteicos, do citosol e do núcleo, para os androgénios.

AS GLÂNDULAS SEBÁCEAS PREPUCIAIS DO RATO

Grande parte dos conhecimentos que acabámos de rever em relação à biologia das glândulas sebáceas, foram obtidos a partir do estudo das glândulas prepuciais do rato que, pelo seu tamanho e acessibilidade, se prestam sobremaneira a essa investigação. Efectivamente, trata-se de duas massas glandulares alongadas, simétricas, situadas no tecido celular subcutâneo de cada lado do pénis ou do clitóris. Até à terceira semana de idade são piriformes e de cor branca nacarada. Tornam-se posteriormente espalmadas, de cor rósea-amarelada e aumentam marcadamente de volume até atingirem, entre a sétima e a décima semana, 12 a 15 mm de comprimento e 5 a 6 mm de largura. A configuração é semelhante nos dois sexos, se bem que os ratos machos adultos apresentem geralmente glândulas mais volumosas e canais excretores extraglandulares mais longos (Beaver, 1960). As glândulas dos animais velhos são mais consistentes e frequentemente apresentam dilatações císticas acastanhadas.

Do ponto de vista histológico são glândulas holócrinas, túbulo-acinosas compostas, com canais excretores bem desenvolvidos que se abrem no exterior independentemente dos pêlos (Leydig, 1850; Gegenbaur, 1898; Müller, 1902; Schaffer, 1933; Montagna e Noback, 1946; Grandjean, 1959; Beaver, 1960). Como qualquer outra glândula sebácea, as glândulas prepuciais do rato formam-se durante a vida fetal por invaginação da epiderme (no caso particular da epiderme parameatal) e proliferação das células basais da porção invaginada (Stuzmann, 1898;

Beaver, 1960). À data do nascimento, apresentam-se como aglomerados de pequenos ácinos primordiais com ducto glandular incipiente (Pannese, 1954; Grandjean, 1959; Beaver, 1960). No fim da primeira semana de vida, são já visíveis macroscopicamente (Beaver, 1960). Na terceira semana estruturam-se em lóbulos (Grandjean, 1959) e na sexta o aspecto histológico das glândulas é idêntico ao das dos ratos adultos (Grandjean, 1959; Beaver, 1960). Nestes, as glândulas prepuciais dos machos são mais activas e apresentam rede ductular mais desenvolvida do que as das fêmeas (Pannese, 1954; Montagna e Noback, 1946; Beaver, 1960; Freinkel, 1963).

A composição química do produto de secreção das glândulas prepuciais do rato é muito semelhante à do sebo das glândulas da pele do homem (Nicolaides, 1965). Efectivamente, estudos cromatográficos do sebo e de extractos glandulares mostraram que as glândulas prepuciais do rato segregam ácidos gordos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, céridos, escaleno, fosfolípidos e colesterol (Nicolaides, 1965; Nicolaides *et al.*, 1968; Freinkel e Aadalen, 1964; Gallo, 1966; Helmy e Hack, 1967). No total dos lípidos, Freinkel e Aadalen (1964) separam 41,7 p. 100 de gorduras neutras, 46,5 p. 100 de escaleno, 4,8 p. 100 de ácidos gordos e 2, 9 p. 100 de fosfolípidos. É sobretudo pelo elevado teor em triglicéridos e em escaleno que as secreções das duas glândulas se assemelham.

Finalmente, frizemos mais uma vez o estreito paralelismo observado entre a resposta hormonal das glândulas sebáceas prepuciais do rato e a das glândulas sebáceas da pele humana. Como estas, as glândulas prepuciais do rato hipertrofiam-se e segregam mais sebo após a administração de androgénios (Korenchevsky e Dennison, 1934 a, b, 1936 a, b; Pannese, 1954; Ebling, 1957 a, b; Beaver, 1960; Sherins e Bardin, 1971) e atrofiam-se e produzem menos secreção após a orquidectomia (Korenchevsky e Dennison, 1934 a, b; Ebling, 1957 a, b; Beaver, 1960; Sherins e Bardin, 1971) ou a injecção de estradiol (Beaver, 1960). Acresce que a sua actividade funcional depende também de factores hipofisários (Noble e Collip, 1941 a, b; Jacot e

Selye, 1951; Huggins *et al.*, 1955; Beaver, 1960; Yip e Freinkel, 1964).

Porém, as glândulas prepuciais do rato são peculiares entre as demais glândulas sebáceas pelo facto de as suas células acinosas segregarem não só gotículas lipídicas mas também grânulos perinucleares especiais (Müller, 1902; Disselhorst, 1904; Walter, 1924; Schaffer, 1933; Beaver, 1959, 1960). Tais grânulos são eosinófilos (Schaffer, 1933; Beaver, 1959, 1960), PAS-positivos (Brown e Williams, 1972), positivos ao teste da hemateína ácida de Baker para os fosfolípidos (Beaver, 1960); Brown e Williams, 1972) e às reacções gerais de caracterização das proteínas (Beaver, 1960; Brown e Williams, 1972). Pelo conjunto destes resultados, deduziu-se que a composição química dos grânulos perinucleares devia consistir numa mistura de substâncias lipoproteicas e de glicoproteínas (Beaver, 1960; Brown e Williams, 1972). São ainda dotados de actividades hidrolásicas, nomeadamente de fosfátase ácida e de β-glucuronídase (Hayashi, 1964, 1967). Ao microscópio electrónico, estes grânulos mostraram-se revestidos por membrana e preenchidos por matriz de densidade variável contendo, por vezes, inclusões cristalóides. Todavia, desconhece-se a localização dos compostos identificados por métodos citoquímicos em microscopia de luz, em relação aos componentes ultrastruturais dos grânulos. O seu modo de formação também não está esclarecido (Beaver, 1963; Dangelo e Munger, 1964). Finalmente, aventou-se a hipótese de que as massas cristalóides que se observam no sebo destas glândulas resultassem da transformação dos grânulos perinucleares (Schaffer, 1933; Beaver, 1963; Brown e Williams, 1972).

A despeito do grande número de conhecimentos acumulados sobre a biologia celular da secreção holócrina, subsistem ainda muitas incógnitas. Assim:

I. Refere-se frequentemente a existência de membrana limitante das gotículas lipídicas mas desconhece-se a sua morfo-

logia fina e as relações exactas com o retículo endoplásmico adjacente. Tão-pouco parece assente a origem dos lípidos no aparelho de Golgi ou no citoplasma fundamental. Por outro lado, os dados resultantes do estudo citoquímico das gotículas lipídicas são escassos quando comparados com os dados bioquímicos. Todavia, os primeiros revestem-se de excepcional valor uma vez que são os únicos que permitem destrinçar a presença dos lípidos no parênquima secretor ou no sebo propriamente dito.

II. As diferentes fases da diferenciação das células secretoras encontram-se mal caracterizadas, em parte devido ao crescimento contínuo das vesículas lipídicas que, ao assumirem enormes dimensões nas glândulas cutâneas, tornam difícil o exame das transformações sofridas pelo citoplasma durante o processo. O seu término, a desagregação holócrina, é talvez, pelo mesmo motivo, quase totalmente desconhecido do ponto de vista citológico. Carece-se, em especial, de informações precisas acerca dos locais de actuação das hidrólases lisosómicas durante a desagregação.

III. É mal conhecida, no caso das glândulas sebáceas prepuciais, a citoquímica fina das diversas porções que compõem os grânulos perinucleares e o seu significado funcional. Nomeadamente, falta elucidar a diferença entre as matrizes clara e electrono-densa e o modo de formação dos diversos componentes dos grânulos.

IV. Finalmente, embora se tenha levantado a hipótese de que nos canais excretores se adicionem novos materiais ao sebo, o seu revestimento epitelial não foi objecto de exame ultrastrutural aprofundado.

Por estes motivos, pareceu-nos útil efectuar um estudo cuidadoso do processo da secreção holócrina através do exame da morfologia ultrastrutural da diferenciação, maturação e involução celulares, e da determinação, por processos citoquímicos, das transformações sofridas, localmente, pelos seus componentes químicos e enzimáticos.

Escolhemos, para o efeito, a glândula sebácea prepucial do rato pelo facto de ser especialmente favorável, ao contrário das glândulas sebáceas cutâneas (por onde iniciámos o estudo), a uma caracterização morfológica das várias etapas do processo diferenciativo, e por responder, com notável constância, às estimulações hormonais. Estas, ao acarretarem o exagero ou o bloqueio de certos processos secretórios, revelaram-se particularmente úteis na elucidação de alguns detalhes da biologia celular das células em transformação.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL NORMAL

Utilizaram-se ratos de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Centro de Biologia do Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras-Portugal), de idades compreendidas entre 1 semana e 9 meses.

As glândulas prepuciais foram enucleadas sob anestesia pelo éter e imediatamente fixadas por imersão. Nalguns animais procedeu-se à expressão manual do sebo e execução de esfregaços em lâminas de vidro.

Microscopia de luz

Para o *estudo morfológico* utilizaram-se glândulas fixadas em formol tamponado a 4 p. 100 (Lillie, 1965) (24 horas), em líquido de Bouin (24 horas) ou em líquido de Helly (20 horas) e incluídas em parafina. Cortes seriados, longitudinais e transversais, foram corados pela hemateína-eosina (5 e 3-10 minutos, respectivamente), pela hematoxilina de Harris (16 horas, após fixação em Helly) e pela hematoxilina férrica de Heidenhain (2 horas, após fixação em formol tamponado de Lillie).

A *determinação do índice mitótico* efectuou-se em glândulas de dois ratos machos de 150 a 170 g de peso, injectados subcutaneamente, às 10 horas da manhã, respectivamente com 0,15 e 0,17 mg de colquicina (Bertalanffy, 1957). Seis horas mais tarde, os animais foram decapitados e as suas glândulas prepuciais enucleadas, fixadas em líquido de Bouin e incluídas em parafina. Em cortes de 7 μm, corados pela hemateína-eosina, contaram-se os núcleos em metafase existentes em 1 000 células basais dos ácinos primordiais e em igual número nas dos túbulos glandulares de cada animal.

Para o *estudo citoquímico* utilizaram-se os seguintes métodos:

GLÍCIDOS

Ácido periódico-reagente de Schiff (PAS), em cortes de parafina e de congelação de 5-12 μm de espessura, de peças fixadas em formol-cálcio de Baker (24 horas a 4°C), em formol-salgado (16 horas a 4°C) ou em formol a 4 p. 100 (7 dias à temperatura ambiente). Alguns cortes foram corados pelo reagente de Schiff sem oxidação prévia pelo ácido periódico.

Ferro coloidal de Hale modificado por Mowry (1957) — Cortes de parafina de 7-10 μm de glândulas fixadas em líquido de Carnoy (24 horas à temperatura ambiente), foram corados pelo ferro coloidal durante 60 minutos.

PROTIDOS

Reacção do tetrazónio acoplado de Danielli (Ganter e Jollès, 1969), em cortes de parafina de 5-10 μm, de peças fixadas em líquido de Carnoy (24 horas à temperatura ambiente).

Reacção do diidroxi-2,2-dinaftil-6,6-dissulfureto (DDD) de Barrnett e Seligman (Pearse, 1960) — Usaram-se cortes de parafina de peças fixadas em líquido de Helly e, como sal de

diazónio, o sal azul rápido B *(fast blue salt B)*. A identificação dos grupos — SS efectuou-se por redução com o ácido tioglicólico (4 horas a 37°C). O controlo das reacções fez-se por bloqueio dos grupos sulfidrilo com o ácido iodoacético (20 horas a 37°C) ou a N-etilmaleimida (4 horas a 37°C) (Ganter e Jollès, 1969).

LIPIDOS

Teste da hemateína-ácida de Baker (Lison, 1960), em cortes de congelação de 5 μm de espessura, de peças fixadas em formol-cálcio (6 horas a 4°C). Como contraprova efectuou-se a coloração após tratamento com piridina (2 horas à temperatura ambiente e 24 horas a 60°C), em peças fixadas pelo líquido de Bouin fraco (20 horas) (Lison, 1960).

Método do OTAN (Tetróxido de Ósmio-Alfa-Naftilamina) de Adams (1959) (Adams, 1965), em cortes de congelação de 5-12 μm, de peças fixadas em formol-cálcio (24 horas a 4°C). Alguns cortes foram submetidos a extracção pela acetona (24 horas a 4°C) ou a hidrólise pelo hidróxido de sódio 2 M (1 hora a 37°C) antes da coloração *(método do OTAN modificado para a esfingomielina)* de Adams e Bayliss (1963) (Adams, 1965).

Negro de Sudão B (Lison, 1960) dissolvido em etanol a 70 p. 100 (Pearse, 1960) ou em etilenoglicol a 0,3 p. 100 (Chiffelle e Putt, 1951), durante 2 a 60 minutos, à temperatura ambiente e a 60°C, em cortes de congelação de 5-10 μm, de peças fixadas em formol-cálcio de Baker (4 horas a 4°C). Antes da coloração, alguns cortes foram tratados pela acetona (24 horas a 4°C).

Oil red O (Pearse, 1960) — Fez-se actuar o corante durante 5 minutos, à temperatura ambiente, em cortes de congelação idênticos aos do método anterior.

Sulfato do azul do Nilo de Dunnigan (Ganter e Jollès, 1969), em cortes de congelação de 10 μm, tratados ou não pela acetona, de glândulas fixadas em formol-cálcio (4 horas a 4°C). Alguns cortes foram paralelamente corados por uma solução saturada de Negro de Sudão B em álcool a 70°C (30 minutos à temperatura ambiente).

Método do cobre-ácido rubeânico de Holczinger (Bancroft, 1967) — Utilizaram-se cortes de congelação de 5-10 μm, de peças fixadas em formol neutro a 4 p. 100 (24 horas).

Reacção do ácido perclórico-naftoquinona (PAN) de Adams (1961) (Adams, 1965), em esfregaços da secreção glandular e em cortes de congelação de 5-20 μm, de material fixado em formol-cálcio (1 semana a 4°C). Seguiu-se exame microscopico imediato.

Reacção de Schultz (1924-25) (Lison, 1960) — Utilizaram-se esfregaços da secreção glandular e cortes de congelação de 20 μm, de peças fixadas em formol-cálcio. A observação dos esfregaços e dos cortes efectuou-se nos 60 minutos imediatos à montagem.

Pesquisa da birrefringência — Efectuou-se no microscópio de polarização utilizando cortes de congelação de 5-12 μm de espessura, não corados e montados em água, de material fixado em formol a 4 p. 100.

ENZIMAS

Fosfátase ácida

Método de Gomori (variante de Barka e Anderson, 1963) — Cortes de congelação de 5-10 μm de espessura de glândulas fixadas em formol-cálcio (16 horas a 4°C) foram incubados em glicerofosfato de sódio-nitrato de chumbo (2-15 minutos a 37°C) e corados pelo sulfureto de amónio.

Método de Barka e Anderson (1962) — Cortes de congelação de 5 μm, de peças fixadas em formol-cálcio (24 horas

a 4°C), foram incubados em fosfato de naftol AS-BI-hexazónio de pararosanilina (5-30 minutos a 37°C).

β-glucuronídase

Reacção de Hayashi (1964) — Incubaram-se cortes idênticos aos anteriores em glucuronato de naftol AS-BI-hexazónio de pararosanilina (2-15 minutos a 37°C). Alguns cortes foram submetidos a contraste nuclear com o hemalúmen de Mayer (5 minutos).

N-acetil-β-glucosaminídase

Reacção de Hayashi (1965) — Cortes de congelação de 5 μm de peças fixadas em formol-cálcio (24 horas a 4°C), foram incubados em naftol AS-BI-N-acetil-β-glucosaminato (5-60 minutos a 37°C).

Aril sulfátases A e B

Reacção de Goldfisher (1965) — Cortes de congelação de 5 μm de fragmentos fixados em formol-cálcio (8 dias), incubaram-se em sulfato de nitrocatecol-nitrato de chumbo a pH 4,2 (aril sulfátase A) e a pH 5,5 (aril sulfátase B) (5-30 minutos a 37°C).

Diidrofenilalamina (DOPA)-oxídase

Reacção da DOPA-oxídase (Burstone, 1962) — Cortes de parafina de 7 μm de espessura, de peças fixadas em formol a 4 p. 100 (6 horas), foram incubados a 37°C (30 minutos a 4 horas) num soluto a 0,1 p. 100 de diidrofenilalamina (DOPA).

Os controlos constaram de omissão dos substratos dos meios de incubação e tratamento dos cortes, em água destilada a 80°C, durante 10 minutos. No estudo da fosfátase ácida procedeu-se ainda à inibição da enzima pelo fluoreto de sódio 0,01 M (10 minutos).

Para a *identificação de macrófagos* utilizou-se a **coloração vital pelo azul do trípano** (Ham, 1969). Injectaram-se 0,25 cc

de um soluto aquoso de azul do trípano a 1 p. 100 à volta dos canais excretores extraglandulares das glândulas prepuciais de 2 ratos adultos. Passadas 24 e 48 horas, os canais foram removidos, fixados em líquido de Bouin, incluídos em parafina e seccionados em cortes que se coraram pelo hemalúmen de Mayer para contraste nuclear.

Microscopia electrónica

Para o *estudo morfológico,* as glândulas prepuciais foram submetidas aos seguintes tipos de fixação:

1. Tetróxido de ósmio a 1 p. 100 em tampão de Millonig (1961), pH 7,3, durante 2 horas a 4°C.

2. Glutaraldeído a 2,5 p. 100 em tampão de Millonig (1961), pH 7,3, durante 2 horas a 4°C, com lavagem no mesmo tampão adicionado de 7,5 p. 100 de sacarose, pelo espaço de 24 horas a 4°C, seguida ou não de fixação pelo tetróxido de ósmio a 1 p. 100 em tampão de Millonig(1961), durante 2 horas a 4°C.

3. Glutaraldeído a 3,4 p. 100 em tampão de fosfatos de sódio 0,1 M, pH 7,4 (1 hora a 4°C), seguido de lavagem (24 horas a 4°C).

4. Glutaraldeído a 4,5 p. 100 em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (4 horas a 4°C), seguido de lavagem (24 horas) no mesmo tampão com sacarose e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1 p. 100 em tampão de acetato de sódio-veronal, pH 7,3 (2 horas a 4°C).

5. Soluto a 4 p. 100 em tampão de Millonig (1961), de uma mistura de glutaraldeído a 50 p 100 e de peróxido de hidrogénio a 50 p. 100, na proporção de 9:1 (3 horas a 4°C) (Peracchia e Mittler, 1972), seguido de lavagem, durante a noite, no mesmo tampão com 7,5 p. 100 de sacarose e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1 ou 2 p. 100 em tampão de Millonig (1961), pH 7,3 (2 horas a 4°C).

No estudo da morfologia fina dos canais excretores procedeu-se, sistematicamente, à injecção das soluções de glutaraldeído no canal excretor principal, após expressão do sebo.

Citoquímica ultrastrutural

Oxidação de peças em bloco — Imediatamente após a colheita e antes de serem fixados como em 2. e 3., imergiram-se pequenos fragmentos de glândulas em peróxido de hidrogénio diluído a 3 p. 100 em soluto de Ringer, durante 3 minutos (Peracchia, 1970). Outras peças, fixadas em glutaraldeído a 2,5 p. 100, foram imersas (20 minutos a 4 horas) num soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 e, em seguida, osmiadas como em 1..

Oxidação dos cortes pelo peróxido de hidrogénio e pelo ácido periódico — Cortes ultrafinos de Epon, de tonalidade dourada, de peças fixadas pelo tetróxido de ósmio, soltos ou montados em grelhas de cobre, foram oxidados por um soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 (10-30 minutos), ou por um soluto aquoso de ácido periódico a 10 p. 100 (20-30 minutos) (Monneron e Bernhard, 1966). Alguns cortes, oxidados durante 30 minutos pelo peróxido de hidrogénio, foram subsequentemente tratados pelo acetato de uranilo (30 minutos) ou por um soluto aquoso de tetróxido de ósmio a 2 p. 100 (4 horas), após lavagem em água destilada.

Digestão pela prónase — Cortes ultrafinos de Epon, soltos e de tonalidade amarelo-dourado, de peças fixadas apenas em glutaraldeído ou em glutaraldeído-tetróxido de ósmio (fixação 2), foram postos a flutuar, durante 15 minutos a 24 horas a 40°C, em soluto aquoso de prónase (TAAB Laboratories, England, 47 000 PUK units/g) a 0,5 ou a 1 p. 100, pH 7,4 (ajustado pelo hidróxido de sódio 0,01 M) (Monneron e Bernhard, 1966). Os cortes de peças fixadas pelo tetróxido de ósmio foram previamente oxidados pelo peróxido de hidrogénio ou pelo ácido periódico (Monneron e Bernhard, 1966). Serviram de controlo

cortes colocados, durante o mesmo tempo e à mesma temperatura, em água destilada ou em prónase inactivada pela fervura.

Extracção pela acetona e pelo clorofórmio-metanol — Fragmentos fixados em glutaraldeído a 4,5 p. 100, permaneceram 24 horas em acetona a 4°C ou em clorofórmio-metanol (1:1) a 60°C (Adams, 1965), antes da osmiação.

Coloração pelo acetato de uranilo em bloco — Peças fixadas em glutaraldeído a 2,5 p. 100 e lavadas repetidamente (24 horas a 4°C) em tampão de Millonig (1961), pH 7,3, com 7,5 p 100 de sacarose, foram imersas (2 horas a 4° C) em acetato de uranilo a 0,5 p. 100 em tampão de acetato de sódio-veronal, antes da inclusão.

Reação do ácido periódico/metenamina-prata — Efectuou-se, segundo o método de Rambourg (1967), em cortes soltos, ultrafinos, de glândulas de ratos com duas e oito semanas de idade, fixadas em tetróxido de ósmio ou apenas em glutaraldeído a 2,5 ou 3,4 p. 100 e incluídas em Epon. Cortes não oxidados e oxidados (10-20 minutos) num soluto aquoso a 1 p. 100 de ácido periódico, foram corados, após lavagem em água destilada (24 horas), num soluto aquoso de metenamina (hexametilenotetramina) a 3 p. 100, nitrato de prata a 5 p. 100 e borato de sódio a 2 p. 100, durante 30-60 minutos a 60°C. Após coloração, seguiu-se nova lavagem dos cortes (30 minutos) e passagem ou não por tiossulfato de sódio (Thiéry, 1967), antes da colheita em grelhas de cobre de um buraco cobertas com película de nitrocelulose. Cortes sucessivos de controlo foram seleccionados, no microscópio de luz, antes da observação no microscópio electrónico.

Fosfátase ácida — Incubaram-se (15-30 minutos a 37°C) cortes de criostato, de 50 μm de espessura, de peças fixadas (3 horas) numa mistura de glutaraldeído e peróxido de hidrogénio (fixação 5.), numa solução contendo tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,7, com 7,5 p. 100 de sacarose, acetato de chumbo (1mg/1cc) e α-naftil-fosfato (0,4mg/1cc) (Etherton e

Botham, 1970). Antes e depois da incubação, os cortes foram lavados (30 minutos a 4°C) em tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 5,7, contendo 7,5 p. 100 de sacarose e pós-osmiados. O controlo da reacção fez-se por omissão de α-naftil-fosfato do meio de incubação.

Examinaram-se também cortes espessos de 50 e 75 μm obtidos no micrótomo de Smith e Farquhar (Sorvall TC2 da Ivan Sorvall Incorporation), de peças fixadas em glutaraldeído como em 2. e 4., incubados (15 minutos a 2 horas a 37°C) numa mistura de tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 5, com 7,5 p. 100 de sacarose, nitrato de chumbo (1,2 mg/cc) e β-glicerofosfato de sódio (2,7 mg/cc). Antes da osmiação, as peças foram lavadas duas vezes em tampão de acetato de sódio 0,05 M, pH 5, com 7,5 p. 100 de sacarose, com passagem intermédia por ácido acético a 2 p. 100 (Miller e Palade, 1964). Cortes controlos incubaram-se em meio sem β-glicerofosfato de sódio.

As peças foram incluídas em Epon (Luft, 1961) e os blocos seccionados no ultramicrótomo LKB. Cortes semifinos de 1-2 μm coraram-se pelo Negro de Sudão B (McGee-Russel e Smale, 1963), PAS (Coimbra e Leblond, 1966), azur II (Richardson *et al.*, 1960), ácido peracético-hematoxilina (Grimley, 1964) e pelo sulfureto de amónio (Jennings *et al.*, 1959). Os cortes ultrafinos, montados em grelhas de malha de cobre ou em grelhas de um buraco cobertas com película de nitrocelulose, foram ou não corados pelo acetato de uranilo em solução aquosa saturada e pelo citrato de chumbo (Reynolds, 1963) (10 minutos cada) ou apenas por um destes corantes (20 minutos) e examinados nos microscópios electrónicos Elmiskop IA e 101.

MATERIAL EXPERIMENTAL

Utilizaram-se ratos jovens de ambos os sexos que foram submetidos à manipulação experimental seguinte:

a) Dois ratos machos receberam diariamente 16,5 μg de *benzoato de estradiol* («Progynon B oleoso forte», 1 cc/5 mg de benzoato de estradiol em solução oleosa, Schering AG, Berlin) por via subcutânea, durante 10 dias e foram sacrificados 48 horas depois da última injecção.

b) Dois ratos fêmeas receberam uma injecção subcutânea diária de 1 mg de *propionato de testosterona* («Testoviron», 1 cc/10 mg de propionato de testosterona em solução oleosa, Schering AG, Berlin) durante 5 dias e foram igualmente sacrificados 48 horas depois da última injecção.

c) Dois ratos machos foram orquidectomizados ao perfazerem 35 dias (5 semanas) de idade.

d) Dois ratos machos e dois ratos fêmeas normais serviram de controlos. Além destes, no caso do estudo ultrastrutural do material experimental, examinámos também as glândulas de dois ratos machos e de dois ratos fêmeas normais, previamente injectados, subcutaneamente, durante 5 dias, com 0,1 cc de óleo de sésamo.

Todos os animais foram sacrificados ao atingirem 56 dias (8 semanas) de idade.

Para o estudo das glândulas prepuciais em *microscopia de luz* usaram-se cortes de parafina de 7 μm corados pela hemateína-eosina e cortes de congelação de 5 μm corados pela hemateína-ácida de Baker, pelo Negro de Sudão B e pelo método de Hayashi (1964) para pesquisa da β-glucuronídase.

Em cortes corados pelo método de Baker procedeu-se à determinação de:

1. *Diâmetro dos grânulos perinucleares nas células completamente diferenciadas da porção proximal dos túbulos glandulares*—Em cada animal medimos, com o auxílio da ocular

micrométrica «Wild» e ampliação de 600 x (objectiva de imersão), o maior diâmetro de 100 grânulos perinucleares.

2. *Concentração dos grânulos perinucleares nas mesmas células* — Utilizando a câmara clara «Wild» e ampliação de 600 x contornámos, em papel de máquina, 10 áreas de superfície aproximadamente idêntica ($\sim 10\,000\ \mu m^2$) por animal. A superfície de cada área foi calculada em μm^2 após recorte e pesagem. Contaram-se os grânulos perinucleares em cada área e determinou-se a sua concentração por unidade de superfície.

Em cortes corados pelo Negro de Sudão B medimos:

3. *Diâmetro das gotículas lipídicas na mesma zona trabalhada em 1.*, usando técnica idêntica à referida para os grânulos perinucleares.

O estudo da *morfologia fina* das glândulas prepuciais efectuou-se em cortes, duplamente corados, de peças fixadas pelo tetróxido de ósmio (fixação 1.).

RESULTADOS

ARQUITECTURA GERAL DAS GLÂNDULAS PREPUCIAIS DO RATO

O parênquima glandular compõe-se de unidades secretoras túbulo-acinosas que desembocam em canais excretores (Fig. 1). Cada unidade secretora é constituída por um túbulo glandular (Figs. 2 e 4, *Tub. gland.)*, de diâmetro e comprimento variáveis, em cujo contorno se notam bosseladuras que denominámos ácinos glandulares (Figs. 2 e 4, *AC)*. Estes são mais numerosos na extremidade periférica dos túbulos do que nas suas faces laterais. A unidade secretora é revestida por *células basais* achatadas (Fig. 2, *CB)*. A transição dos túbulos para os canais excretores é assinalada pelo aparecimento de células basais mais volumosas e mais basófilas do que as que revestem os túbulos (Fig. 2, setas).

As células em diferenciação preenchem o lúmen das unidades secretoras e podem subdividir-se em três tipos. As *células em início de diferenciação* (Figs. 2 e 4, *C1)* ocupam o interior dos ácinos glandulares onde são imediatamente adjacentes às células basais. O citoplasma compõe-se de numerosos vacúolos incolores e de zonas moderadamente eosinófilas (Fig. 4, *) preenchidas por grânulos que só se conseguem individualizar utilizando ampliações elevadas. As *células diferenciadas* (Figs. 2 e 4, *C2)* acumulam-se para dentro da desembocadura dos ácinos nos túbulos glandulares, são mais volumosas e apresentam vacúolos maiores e áreas de grânulos acidófilos (Fig. 35) mais

desenvolvidas. As *células completamente diferenciadas* (Figs. 2 e 4, *C3*), dispõem-se ao longo dos túbulos glandulares, são ainda mais volumosas e vacuolizadas e precedem imediatamente o

---

ABREVIATURAS USADAS NAS FIGURAS

A — grânulo perinuclear de matriz clara; AC — ácino glandular; B — grânulo perinuclear de matriz clara com cristalóide no interior; C — grânulo perinuclear de matriz densa; c — capilar; Cl — célula em início de diferenciação; C2 — célula diferenciada; C3 — célula completamente diferenciada; C4 — célula em desagregação; CA — corpo autofágico; CAl — corpo autofágico com vesículas com ribosomas apensos no interior; CA2 — corpo autofágico com membranas no interior; CA3 — corpo autofágico de conteúdo denso e heterogéneo, com ribosomas; CA4 — corpo autofágico com membranas concêntricas à periferia e interior heterogéneo; CAN. EXCR. — canal excretor; CB — célula basal; CC — célula córnea; Cc — célula clara; CD — corpo denso; CE — célula espinhosa; CG — célula granulosa; Cr — cristalóide; CT — célula de transição; D — grânulo perinuclear de matriz densa com cristalóide no interior; Ep. — epitélio de revestimento; FA — fibrila de ancoragem; Go — aparelho de Golgi; GMC — grande massa cristalóide; L — gotícula lipídica; LB — lâmina basal; M — matriz dos grânulos perinucleares; mi — mitocôndria; N — núcleo; Nu — nucléolo; r — ribosomas; REL — retículo endoplásmico liso; RER — retículo endoplásmico rugoso; S — sebo; T — tonofilamentos; TC — estroma conjuntivo; TUB. GLAND. — túbulo glandular; v — vénula.

Figs. 1 a 7 — Microscopia de luz de glândulas sebáceas prepuciais de ratos machos adultos.

Fig. 1 — Corte longitudinal mostrando parênquima glandular (1), canais excretores secundários (2) e porção intraglandular do canal excretor principal (3). Septos celulares na confluência dos canais excretores secundários (setas curtas) e destes com o canal excretor principal (setas longas). S — sebo. Fixação: líquido de Helly. Coloração: hemateína-eosina. 67 ×

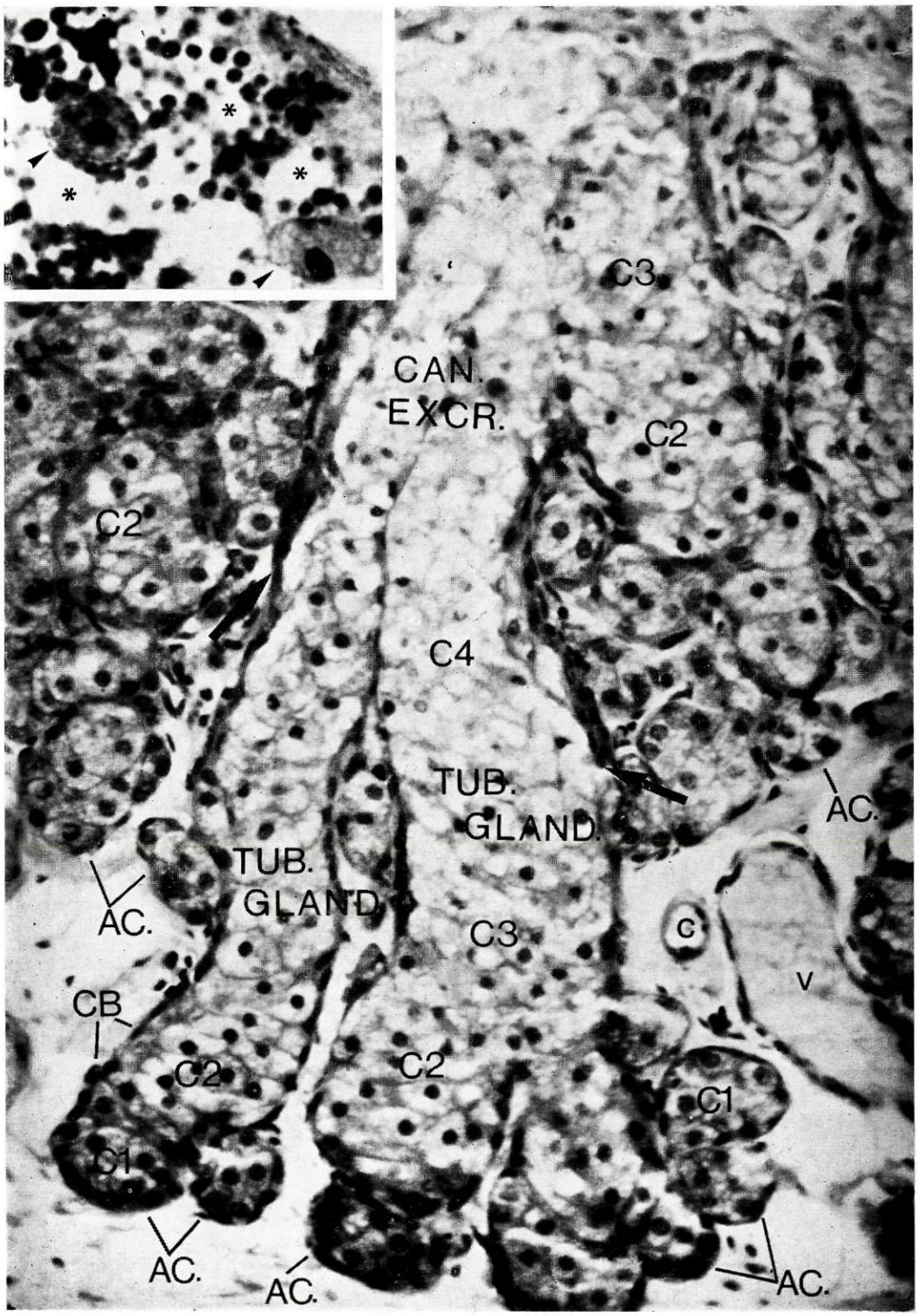
Fig. 2 — Unidades secretoras túbulo-acinosas. Ácinos glandulares (AC) e túbulos glandulares (TUB. GLAND.). Células basais (CB), em início de diferenciação (C1), diferenciadas (C2), completamente diferenciadas (C3) e em desagregação (C4). As setas indicam a transição dos túbulos glandulares para o canal excretor secundário (CAN. EXCR.). Capilar (c) e vénula (v) no estroma conjuntivo. Fixação e coloração como na figura anterior. 228 ×

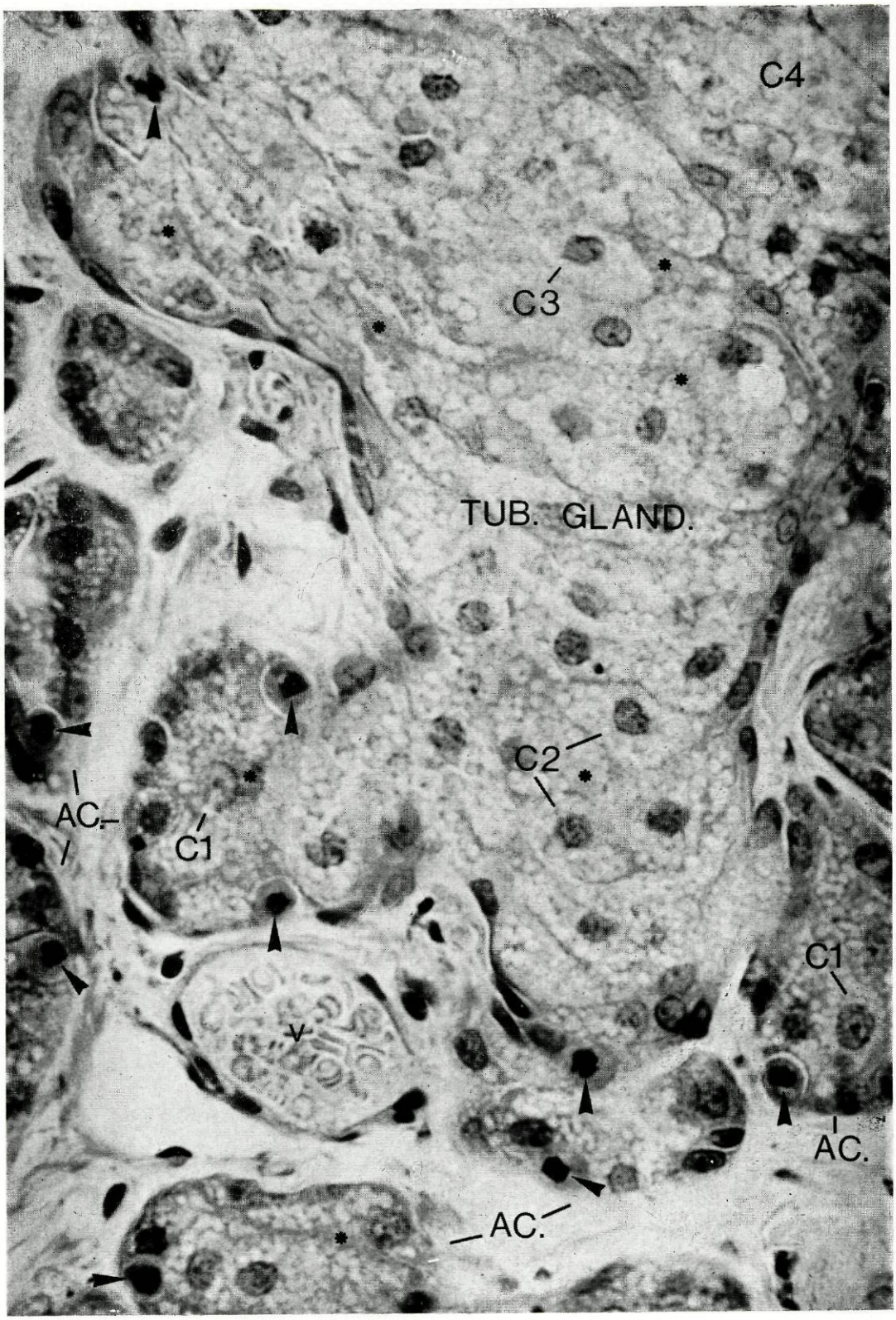
Fig. 3 — Células em início de diferenciação com grânulos perinucleares corados de azul escuro e gotículas lipídicas incolores (*). As setas apontam núcleos de células. Fixação: formol tamponado de Lillie (1965). Corte de parafina. Coloração: hematoxilina férrica de Heidenhain (2 horas) com diferenciação pelo alúmen de ferro amoniacal (5 minutos). 1 838 ×

Fig. 4 — Unidade secretora túbulo-acinosa, 6 horas após injecção subcutânea de colquicina. Na assentada de células basais dos ácinos glandulares (AC), observam-se bastantes núcleos em mitose (setas grossas). No citoplasma das células em início de diferenciação (C1), diferenciadas (C2), completamente diferenciadas (C3) e em desagregação (C4), distinguem-se vacúolos claros correspondendo a gotículas lipídicas. Certas zonas acidófilas (*) do citoplasma contêm pequenos grânulos cujo contorno não se desenha com nitidez como sucedia na figura anterior. Vénula (v) no tecido conjuntivo interacinoso. Fixação: líquido de Helly. Coloração: hemateína-eosina. 780 ×



1


3
C3
CAN.
EXCR.
C2
C2
C4
TUB.
GLAND.
AC.
TUB.
GLAND
AC.
C3
C
V
CB
C2
C2
C1
C1
AC.
AC.
AC.
2



4

estádio de destruição celular característico da secreção holócrina. É geralmente na transição dos túbulos glandulares para os canais excretores que surgem os sinais de desagregação celular com má definição dos contornos das células e aumento da basofilia nuclear (Figs. 2 e 4, *C4*). A massa de *células em desagregação (C4)* e o *sebo (S)* enchem o lume dos canais excretores (Figs. 1, 2, 4, 5 e 7).

Os *canais excretores secundários* são revestidos de epitélio simples pavimentoso na sua porção distal (Fig. 2), que se estratifica progressivamente até atingir 6-8 assentadas de células (Fig. 5). Estes canais confluem e desembocam directamente na porção intraglandular do canal excretor principal (Figs. 1 e 5). A desembocadura faz-se, geralmente, em ângulo agudo cujo vértice aponta para o meato prepucial e que é bem marcado por um septo epitelial (Figs. 1, 5 e 92). Em cortes transversais do canal excretor principal, verifica-se que os canais secundários nele desembocam também em ângulo agudo. Estes ângulos, no seu conjunto, estão orientados em sentido dextrógiro na glândula do lado direito e levógiro na do lado esquerdo.

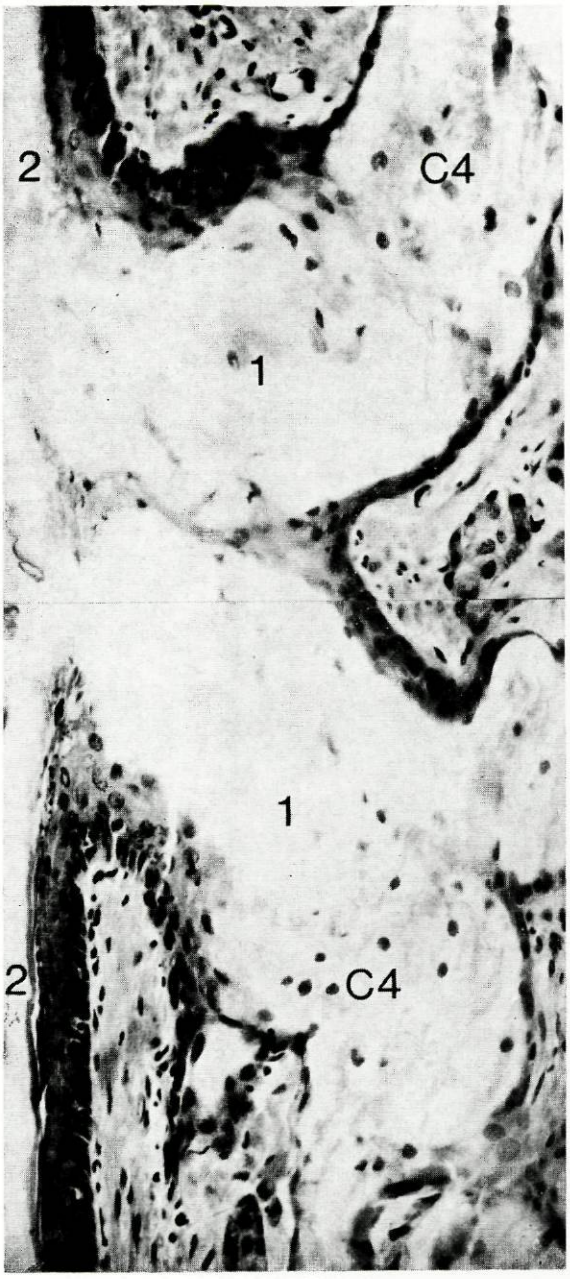
O *canal excretor principal* tem lume muito volumoso e epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com 6-8 assentadas de células na porção intraglandular (Figs. 1, 5 e 92) e 8-15 assentadas na porção extraglandular (Figs. 6 e 106). Abre-se na transição entre a mucosa do meato prepucial e a pele (Fig. 7). A arborização dos canais excretores acentua-se, significativamente, após a terceira semana de vida. Nas glân-

---

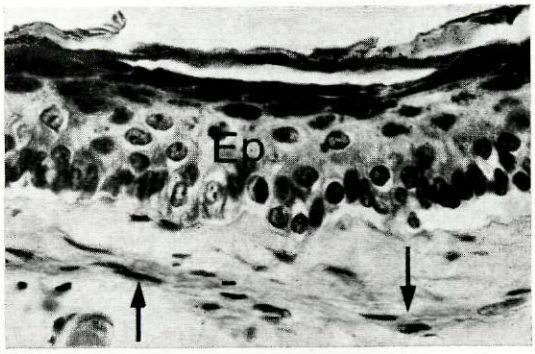
Fig 5 — Corte longitudinal evidenciando desembocadura de canais excretores secundários (1) no canal excretor principal (2). Células em desagregação sebácea (C4). Fixação: líquido de Bouin. Coloração como na figura anterior. 122 ×

Fig. 6 — Corte transversal da porção extraglandular do canal excretor principal. Fibras musculares lisas (setas) no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado (Ep). Fixação e coloração como na figura anterior. 174 ×

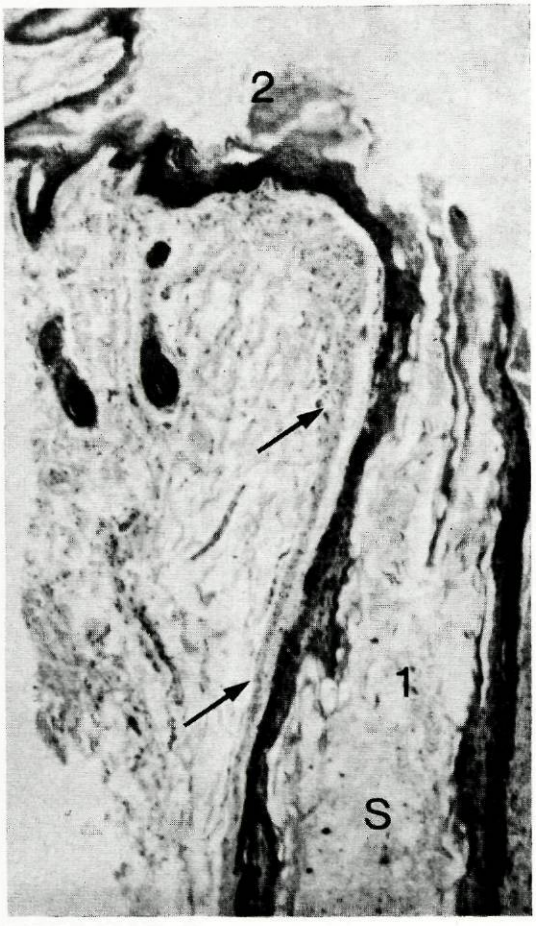
Fig. 7 — Corte longitudinal da porção extraglandular do canal excretor principal (1) junto da abertura no meato prepucial (2). Feixes de fibras musculares lisas em torno do canal (setas). S — sebo. Fixação e coloração como na figura 5. 67 ×



5



6



7

dulas de ratos velhos, os ductos excretores (sobretudo o canal excretor principal) apresentam lume dilatado e formam frequentemente estruturas císticas contendo material eosinófilo no interior.

O *estroma conjuntivo* das glândulas (Figs. 1, 2, 4-7) é mais denso na periferia onde forma uma cápsula fibrosa. É rico em mastócitos com disposição pericanalicular (Fig. 51), contém fibras musculares lisas dispersas, vasos sanguíneos (Figs. 2 e 4) e fibras nervosas mielínicas e amielínicas (Fig. 86). Em redor do canal excretor principal observa-se uma túnica de fibras musculares lisas de orientação circular. Na porção intraglandular do canal, essa túnica compõe-se de 3-4 assentadas de células, enquanto na porção extraglandular o número de assentadas é de 4-8 (Figs. 6 e 7). O estroma conjuntivo é escasso nas glândulas prepuciais de ratos jovens e adultos e abundante nos animais mais idosos.

CITOLOGIA DO PARÊNQUIMA GLANDULAR

Células basais

No microscópio de luz, o núcleo, achatado, apresenta geralmente um ou dois nucléolos e cromatina fina pulverulenta. O citoplasma é levemente basófilo. As células medem 12 μm, em média, entre as extremidades e cerca de 4,5 μm de espessura máxima. O índice mitótico foi de 2,7 p. 100 nas células dos ácinos e de 0,3 p. 100 nas dos túbulos glandulares (médias dos valores determinados em cada animal) (Fig. 4).

Figs. 8 a 27 — Ultrastrutura de células acinosas de glândulas sebáceas prepuciais do rato. Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo.

Fig. 8 — Ácino glandular de rato macho com uma semana de vida. Células basais (CB) e em início de diferenciação (C1) separadas por interstícios, por vezes sinuosos (*), nalguns pontos dilatados e com microvilosidades. No citoplasma das células vêem-se gotículas lipídicas (L), grânulos per nucleares de matriz clara (A) e um grânulo com cristalóide no interior (seta longa). Pequenos corpos densos (setas curtas) na zona apical de uma célula basal. 6 240 ×



8

Ao microscópio electrónico as células basais são achatadas ou triangulares em corte (Fig. 8), mas parecem ter base poligonal visto manterem perfil idêntico em cortes sucessivos. Entre elas e as células vizinhas, observa-se um interstício de 35-50 nm, frequentemente sinuoso, bordado de desmosomas (Fig. 9) e, por vezes, dilatado; nestes pontos, as células apresentam microvilosidades. Do lado do tecido conjuntivo existe uma lâmina basal, de 25 a 50 nm, separada das células por um espaço claro de ~ 40 nm de espessura (Figs. 9 e 10). A membrana celular apresenta, nesta região, hemidesmosomas com tonofilamentos aderentes, a que por vezes correspondem espessamentos limitados da lâmina basal (Fig. 9); esta une-se, com frequência, a fibrilas de ancoragem (Fig. 10). Junto à membrana celular observam-se numerosas vesículas de micropinocitose (Fig. 10).

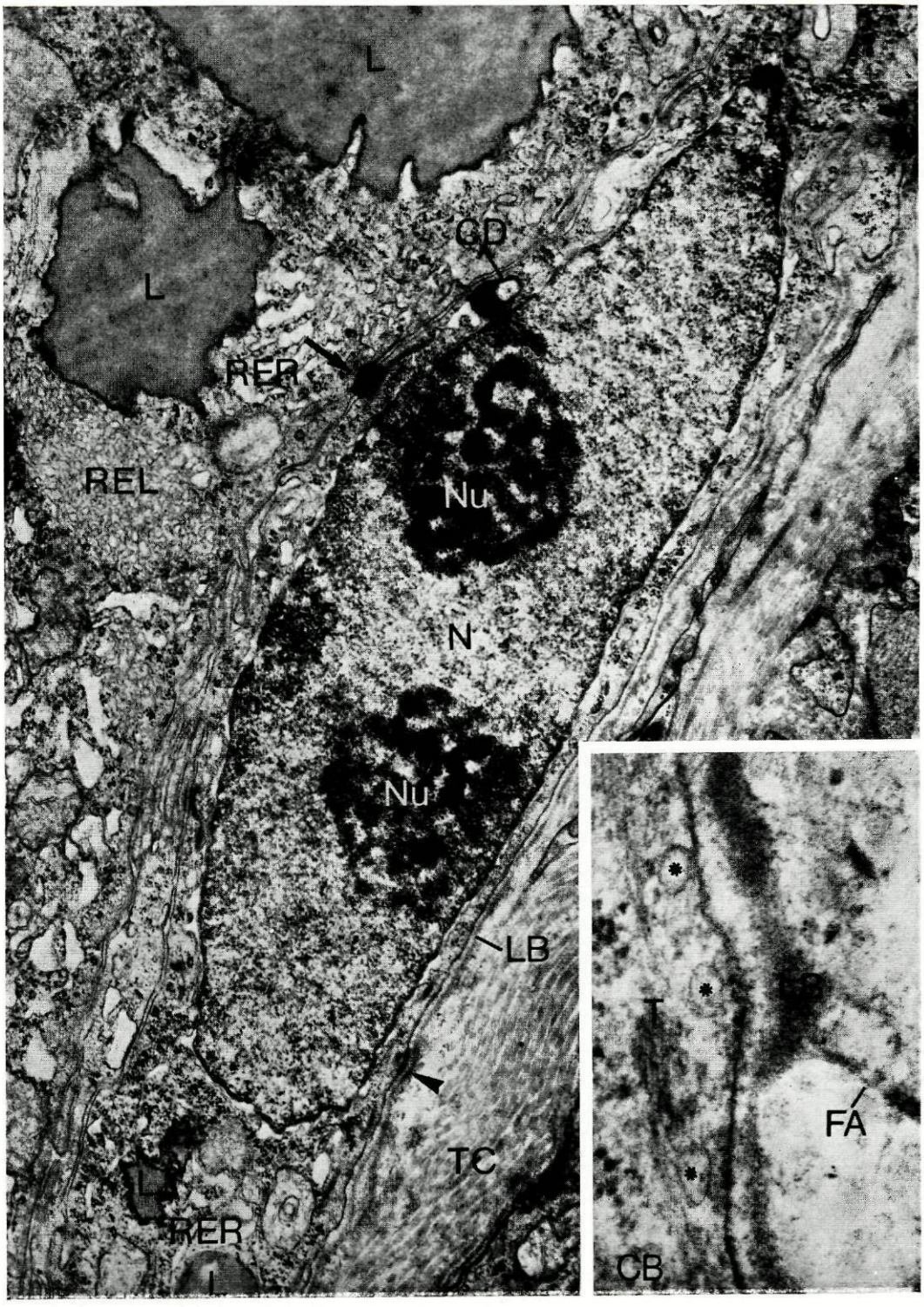
O núcleo das células basais contém cromatina granulosa pouco densa com condensações ocasionais junto da membrana e nucléolos com nucleolonemas típicos (Fig. 9). No citoplasma observam-se cisternas de configuração irregular, por vezes dilatadas, entre as quais há grande número de ribosomas livres. A parede das cisternas é parcialmente revestida por ribosomas (Figs. 9 e 11). Junto dos polos do núcleo situam-se grupos de mitocôndrias de contorno denteado, com pequeno número de cristas e numerosos grânulos (Fig. 11). Notam-se também, na

---

Fig. 9 — Célula basal de rato macho adulto. O núcleo (N), alongado, apresenta dois nucléolos com nucleolonemas (Nu). No citoplasma, observam-se ribosomas livres (r), algumas cisternas dilatadas com ribosomas aderentes (RER), gotículas lipídicas (L) e um corpo denso (CD). Do lado da lâmina basal (LB), vê-se hemidesmosoma (seta curta). No lado oposto da célula há desmosoma com tonofilamentos aderentes (seta longa). No canto superior esquerdo da figura nota-se parte de uma célula diferenciada. 28 000 ×

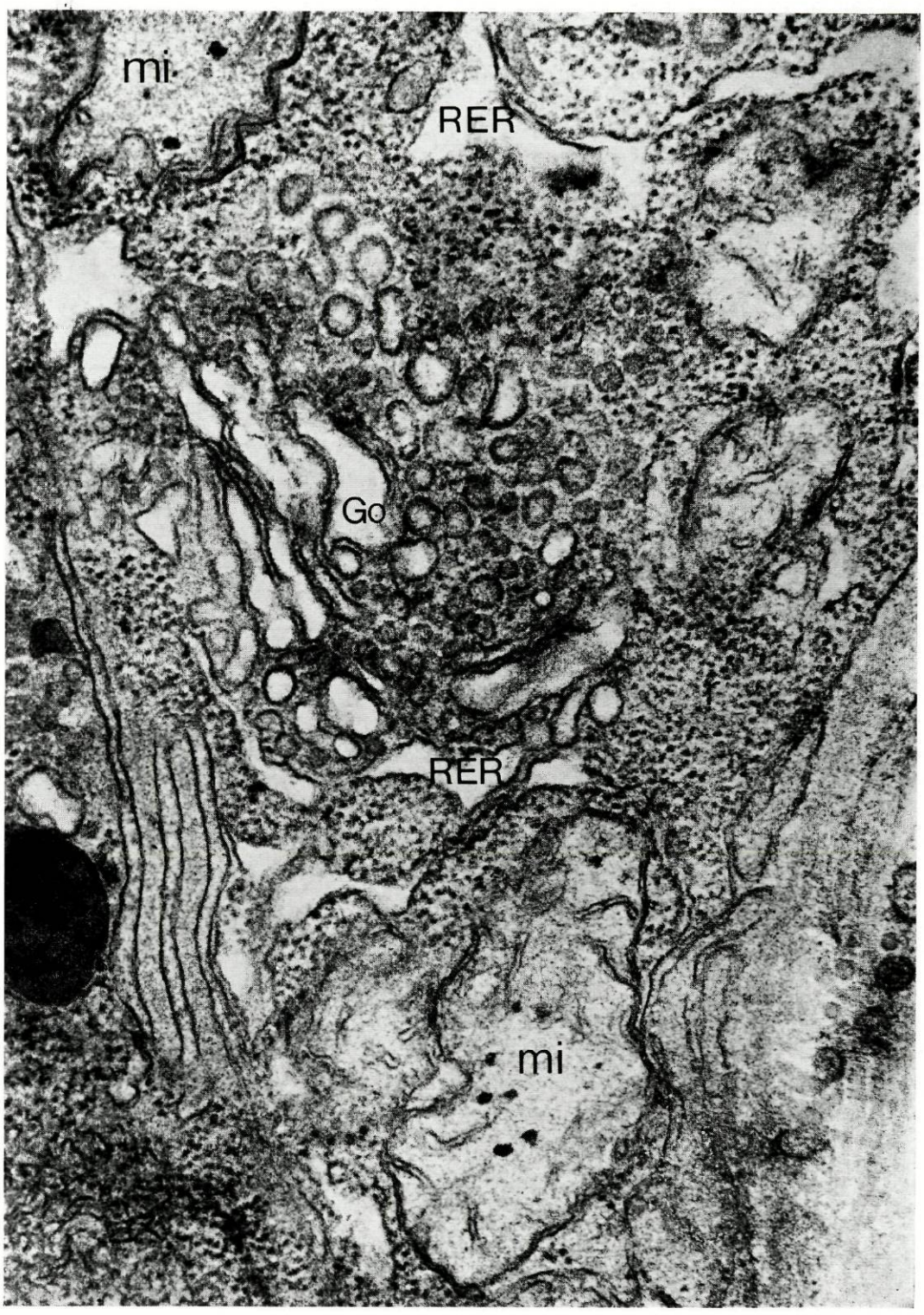
Fig. 10 — Pormenor da lâmina basal (LB) com fibrila de ancoragem (FA). Na periferia da célula basal (CB) observam-se vesículas de micropinocitose (*) e tonofilamentos (T). 60 000 ×

Fig. 11 — Citoplasma de célula basal mostrando numerosos ribosomas livres (r), aparelho de Golgi (Go) com grande número de vesículas periféricas, cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso (RER) e mitocôndrias (mi) de contorno denteado com grânulos mitocondriais. 60 000 ×



9

10


mi
RER
Go
RER
mi

zona paranuclear, complexos de Golgi com cisternas sobrepostas e numerosas vesículas numa das faces (Fig. 11). Sem preferência de localização no citoplasma, vêem-se corpos densos redondos e ovais, medindo 0,1-0,5 μm, rodeados de membrana (Fig. 9). As células contêm, ainda, pequenas gotículas lipídicas densas, sem membrana limitante, mais abundantes no rato novo (Figs. 8 e 9).

Células em início de diferenciação

Revestidas externamente pelas células basais, as células em início de diferenciação são poligonais (dimensão máxima de cerca de 24 μm) e ocupam o interior dos ácinos glandulares (Figs. 2, 4 e 8). O núcleo, redondo, possui um ou mais nucléolos. No citoplasma distinguem-se, no microscópio de luz, grânulos eosinófilos predominantemente situados em redor do núcleo (grânulos perinucleares) e vacúolos incolores (Fig. 4). Os grânulos medem 1,17 ± 0,02 μm (D.P.M.) de diâmetro (medidas de 100 grânulos de ratos machos adultos) e distinguem-se particularmente bem após coloração pela hematoxilina férrica de Heidenhain (Fig. 3). Os vacúolos, com 1,24 ± 0,03 μm (D.P.M.) de diâmetro (50 medições), preenchem aparentemente a maior parte do citoplasma; são incolores nos cortes de parafina mas mostram-se sudanófilos em cortes de congelação (Fig. 45).

No microscópio electrónico, o contorno das células é menos sinuoso do que o das células basais e ao longo do espaço intercelular, de 20-50 nm, há numerosos desmosomas (Fig. 12). Nalguns pontos, as células apresentam microvilosidades curtas. A morfologia fina do núcleo (Fig. 12) é semelhante à do núcleo das células basais. No citoplasma, vêem-se mitocôndrias, uniformemente distribuídas (Fig. 12), com poucos grânulos. As cisternas do retículo endoplásmico rugoso apresentam as mesmas características que nas células basais, mas são mais numerosas. Entre elas há, também, grande quantidade de ribosomas e polirribosomas livres (Figs. 12, 13 e 15). Túbulos de parede lisa rodeiam intimamente gotículas lipídicas sem membrana

limitante (Fig 13) ou aparecem condensados em áreas arredondadas bem circunscritas, pouco numerosas, muitas vezes contíguas a gotículas lipídicas pequenas (Fig. 14). Volumosos complexos de Golgi, constituídos por pilhas de cisternas ou dictiosomas, e por vesículas associadas, de volume variável, assinalam-se na vizinhança do núcleo (Fig. 12). Observam-se, ainda, corpos densos de volume e configuração iguais aos dos descritos nas células basais (Fig. 12).

Os grânulos perinucleares, revestidos por membrana de 8,9 ± 0,1 nm (D.P.M.) de espessura (100 medições), são de dois tipos nos animais adultos. Uns têm matriz clara e finamente floculenta, de densidade variável (Figs. 12 e 15), outros matriz densa e mais homogénea (Fig. 15). Ambos correspondem aos grânulos eosinófilos observados no microscópio de luz. Nas células em início de diferenciação dos ratos adultos, predominam os grânulos de matriz clara (Figs. 12 e 15), os quais são geralmente mais pequenos [1,15 ± 0,02 μm (D.P.M) de diâmetro] do que os densos [1,31 ± 0,07 μm (D.P.M.) de diâmetro] (100 medições). Nos ratos com menos de 3 semanas de idade, os grânulos perinucleares são exclusivamente de matriz

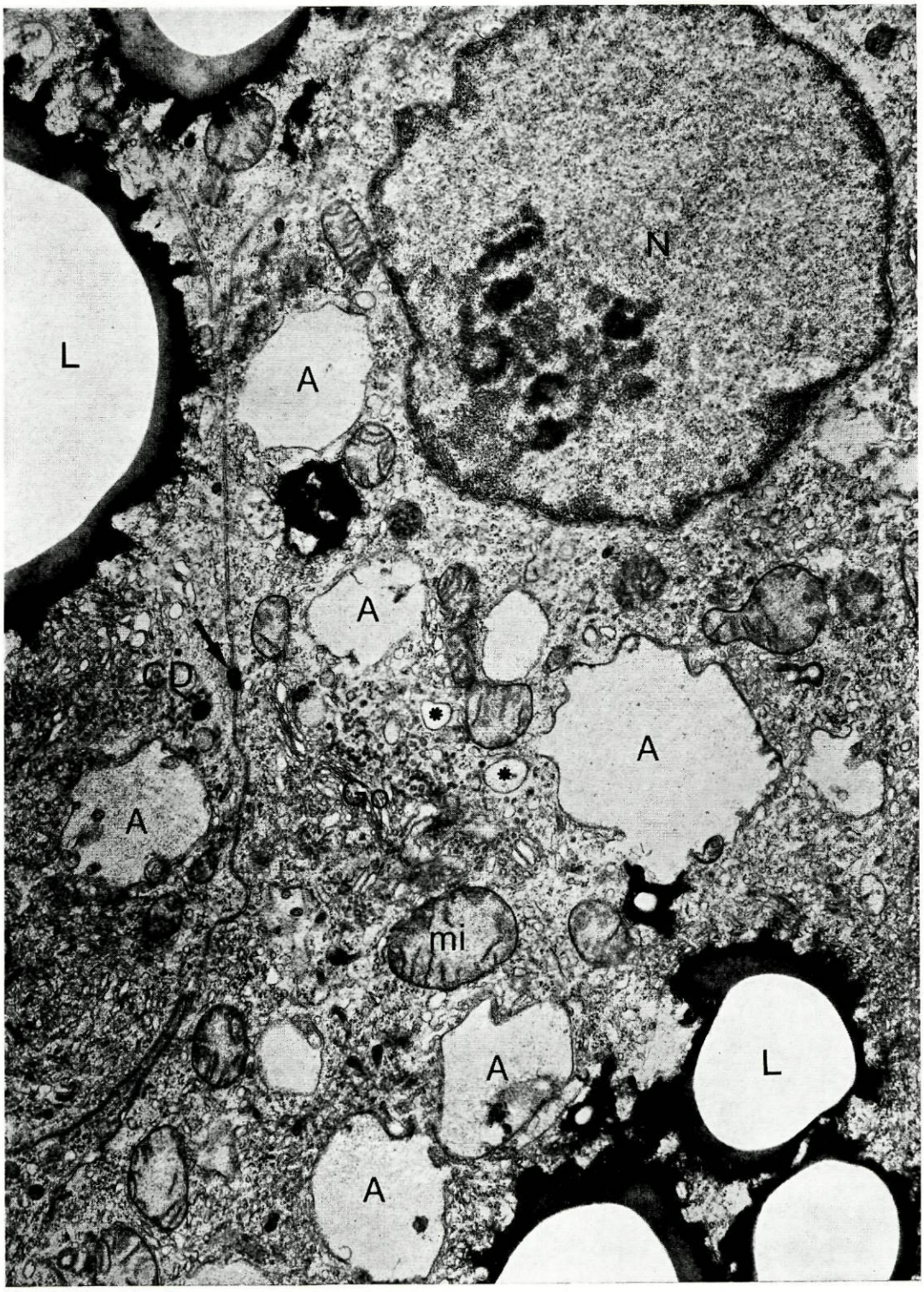
---

Fig. 12 — Células em início de diferenciação de rato macho adulto. No citoplasma observam-se gotículas lipídicas (L), grânulos perinucleares de matriz clara (A), um corpo denso (CD) e um bem desenvolvido aparelho de Golgi (Go). Notar a presença de grânulos de secreção pequenos (*) junto das vesículas do aparelho de Golgi e um desmosoma (seta) na periferia das células. 15 600 ×

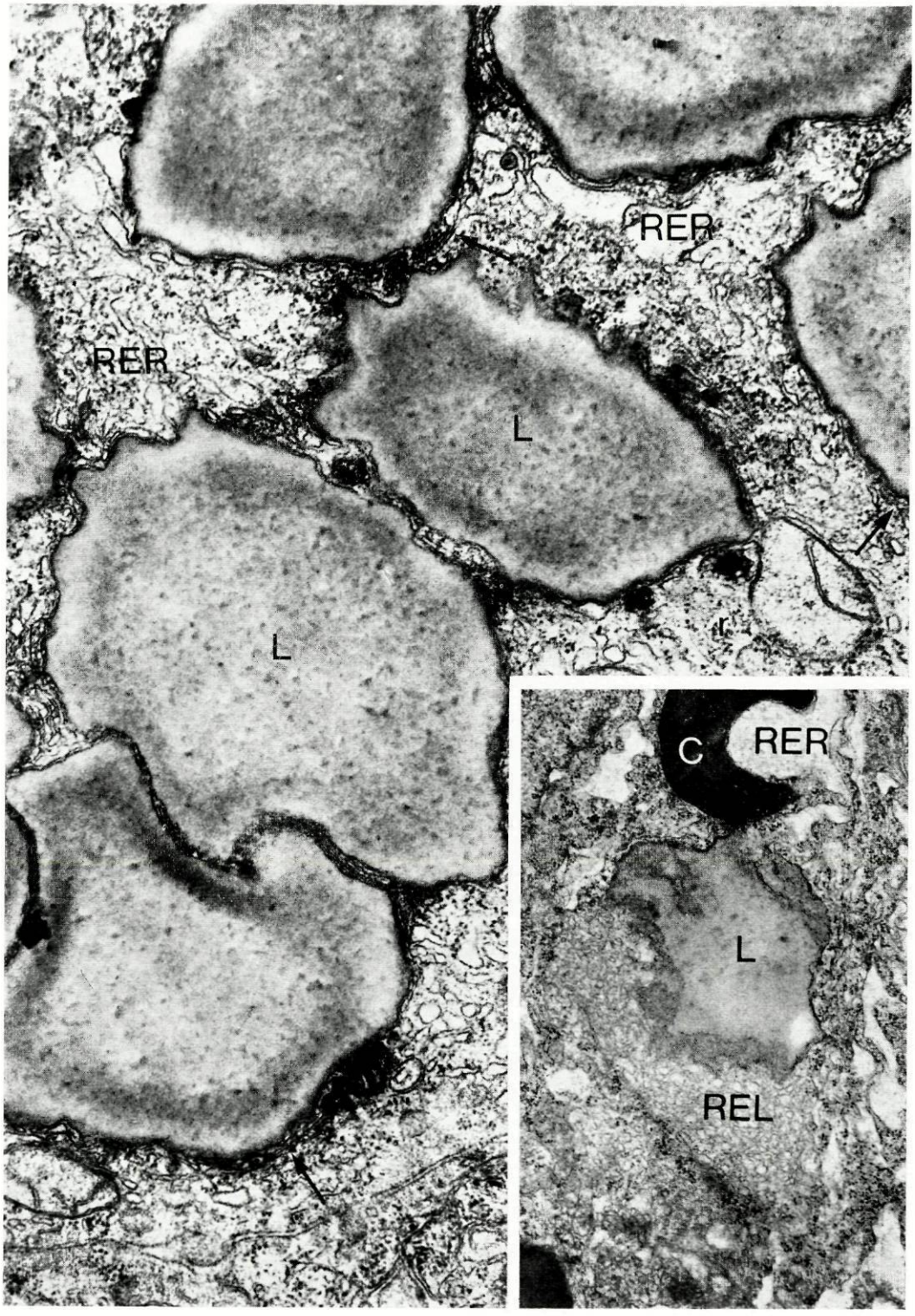
Fig. 13. — Citoplasma de célula em início de diferenciação com várias gotículas lipídicas (L) rodeadas por túbulos de parede lisa (setas). Entre elas, observam-se elementos do retículo endoplásmico rugoso (RER) e ribosomas livres (r). 28 000 ×

Fig. 14 — Pormenor de célula em início de diferenciação com túbulos do retículo endoplásmico liso (REL) intimamente relacionados com gotícula lipídica (L). Notar ainda grânulo perinuclear de matriz densa (C) e cisterna dilatada do retículo endoplásmico rugoso (RER) nele insinuada. 24 000 ×

Fig. 15 — Célula em início de diferenciação de rato fêmea adulto. Observam-se vários grânulos perinucleares de matriz clara (A), grânulos com cristalóides (B) e um grânulo de matriz densa (C). No citoplasma, distinguem-se cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso (RER) e ribosomas livres (r). 15 600 ×

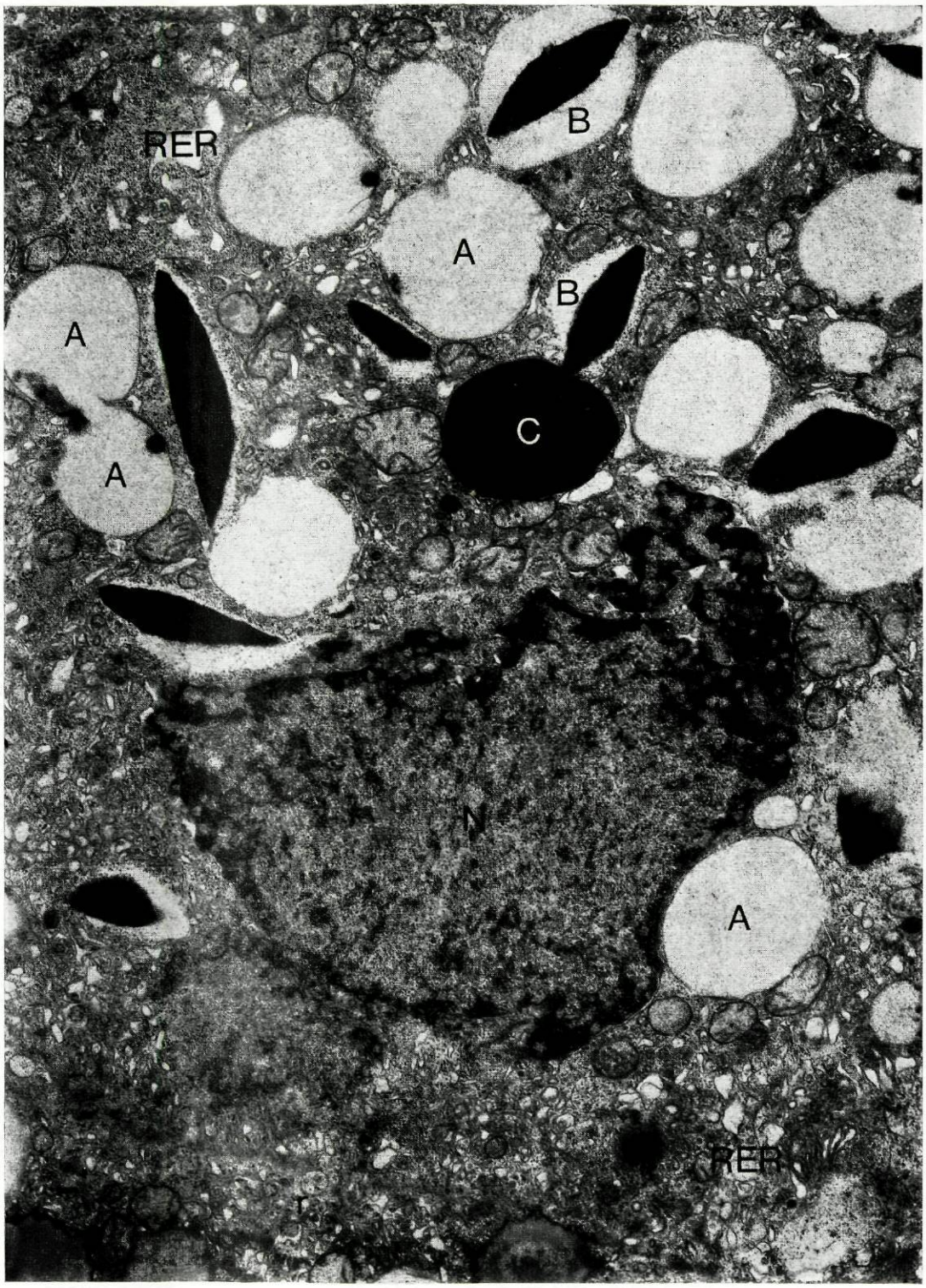


12



13

14



15

clara (Fig. 8). Por vezes observam-se imagens de fusão destes grânulos (Fig. 15). A membrana de qualquer dos tipos de grânulos aparece, nalguns pontos, invaginada para o interior da matriz, formando pequenas áreas arredondadas (Figs. 12, 15, 21, 58 e 87). Frequentemente, destacam-se na matriz dos grânulos uma ou mais inclusões cristalóides densas (Fig. 15) cujo comprimento máximo, nos animais adultos, é de 1 μm. Há também cristalóides livres no hialoplasma, se bem que em número reduzido. Os grânulos perinucleares são, com frequência, contíguos a cisternas do retículo endoplásmico rugoso (Fig. 14) ou a túbulos de parede lisa. É também habitual a existência de grânulos pequenos, claros, junto das vesículas secretoras do aparelho de Golgi aglomeradas numa das faces da pilha de cisternas (Fig. 12); a matriz de muitas destas vesículas é de densidade idêntica à matriz dos grânulos perinucleares (Fig. 12).

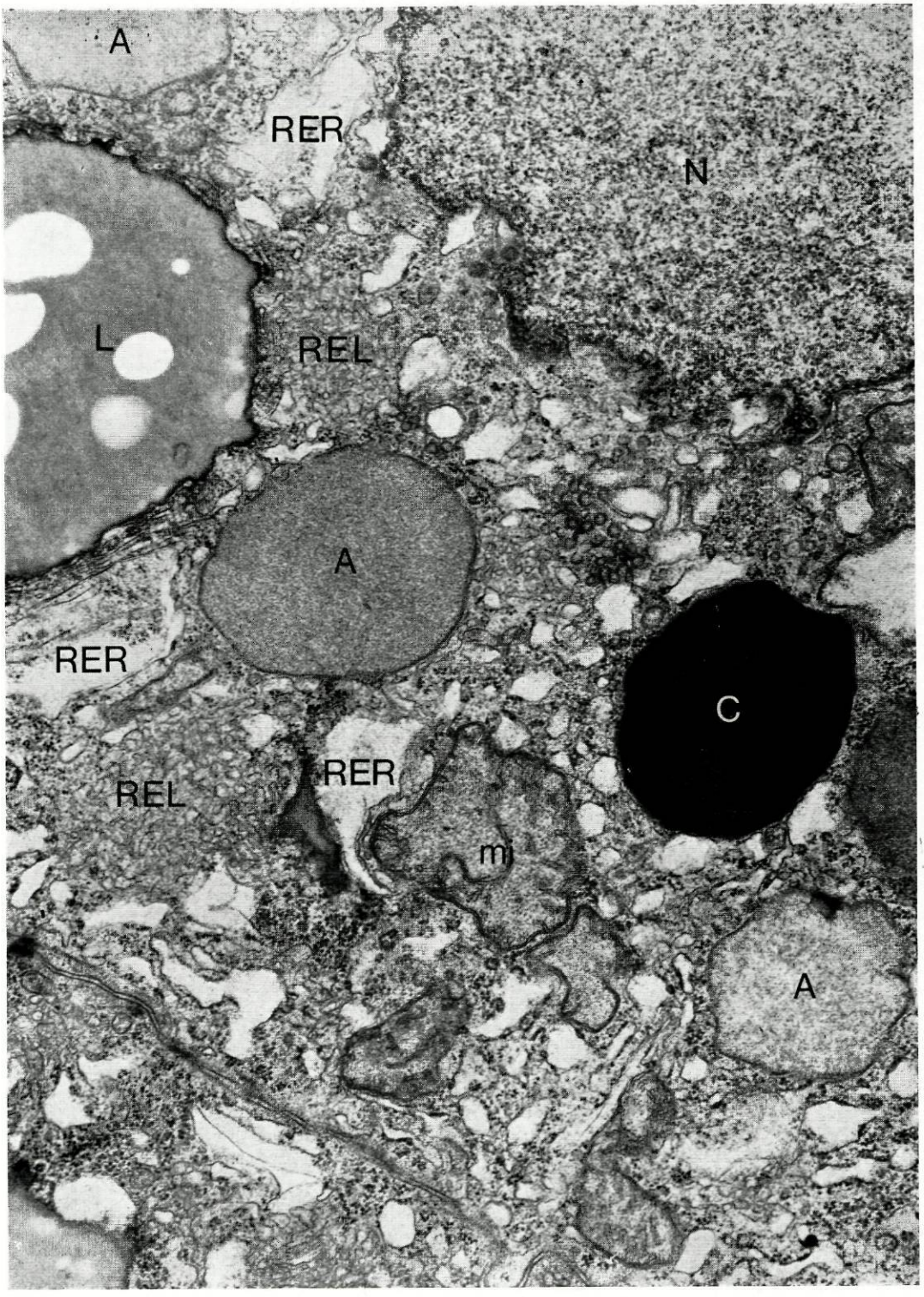
Células diferenciadas

No microscópio de luz, as células diferenciadas são maiores do que as anteriores (dimensão máxima de $\sim 31\ \mu$m). O citoplasma é mais vacuolizado do que o das células em início de diferenciação. Os vacúolos, sudanófilos em cortes de congelação, medem $1{,}96 \pm 0{,}09\ \mu$m (D.P.M.) de diâmetro (50 medições). Os grânulos perinucleares apresentam diâmetro de $1{,}80 \pm 0{,}03\ \mu$m (D.P.M.) (medidas de 100 grânulos de glândulas de ratos machos adultos) e contêm abundantes inclusões cristalóides não coráveis pela hemateína-eosina (Fig. 35).

Ao microscópio electrónico, a estrutura do núcleo não difere da dos núcleos das células anteriores e o nucléolo apresenta, da mesma forma, nucleolonemas típicos. No citoplasma, o retículo

---

Fig. 16 — Célula diferenciada de rato macho com 3 semanas de vida. O retículo endoplásmico rugoso (RER) ocupa maior área e apresenta cisternas mais numerosas e mais dilatadas do que nas células em início de diferenciação. O retículo endoplásmico liso (REL) aparece frequentemente conglomerado em áreas arredondadas. Observam-se ainda grânulos perinucleares de matriz clara e floculenta (A) e de matriz densa (C). 28 000 ×



16

endoplásmico rugoso é mais desenvolvido do que nas células em início de diferenciação com cisternas mais numerosas e mais dilatadas (Figs. 16 e 17). Esta hiperplasia é mais evidente no rato macho do que na fêmea (Figs. 16 e 17). As áreas circunscritas de retículo endoplásmico liso, habitualmente associadas a gotículas lipídicas, são mais volumosas do que nas células em início de diferenciação (medem 1,46 ± 0,08 μm de diâmetro) (50 medições) e os seus túbulos apresentam frequentes continuidades com o retículo endoplásmico rugoso (Fig. 19). Estas áreas são mais evidentes no macho e a partir da terceira semana de vida. Os elementos de parede lisa que envolvem as gotículas lipídicas grandes, formam agora uma zona relativamente espessa de 4 a 8 assentadas de túbulos, muitos dos quais são também contínuos com cisternas de parede rugosa (Fig. 18).

Nos ratos adultos, os grânulos perinucleares de matriz densa predominam relativamente aos de matriz clara; as inclusões cristalóides distinguem-se dificilmente da matriz dos grânulos densos. Nesta observam-se, com frequência, bandas claras rectilíneas, em número de 1 a 3 por corte de grânulo (Fig. 20).

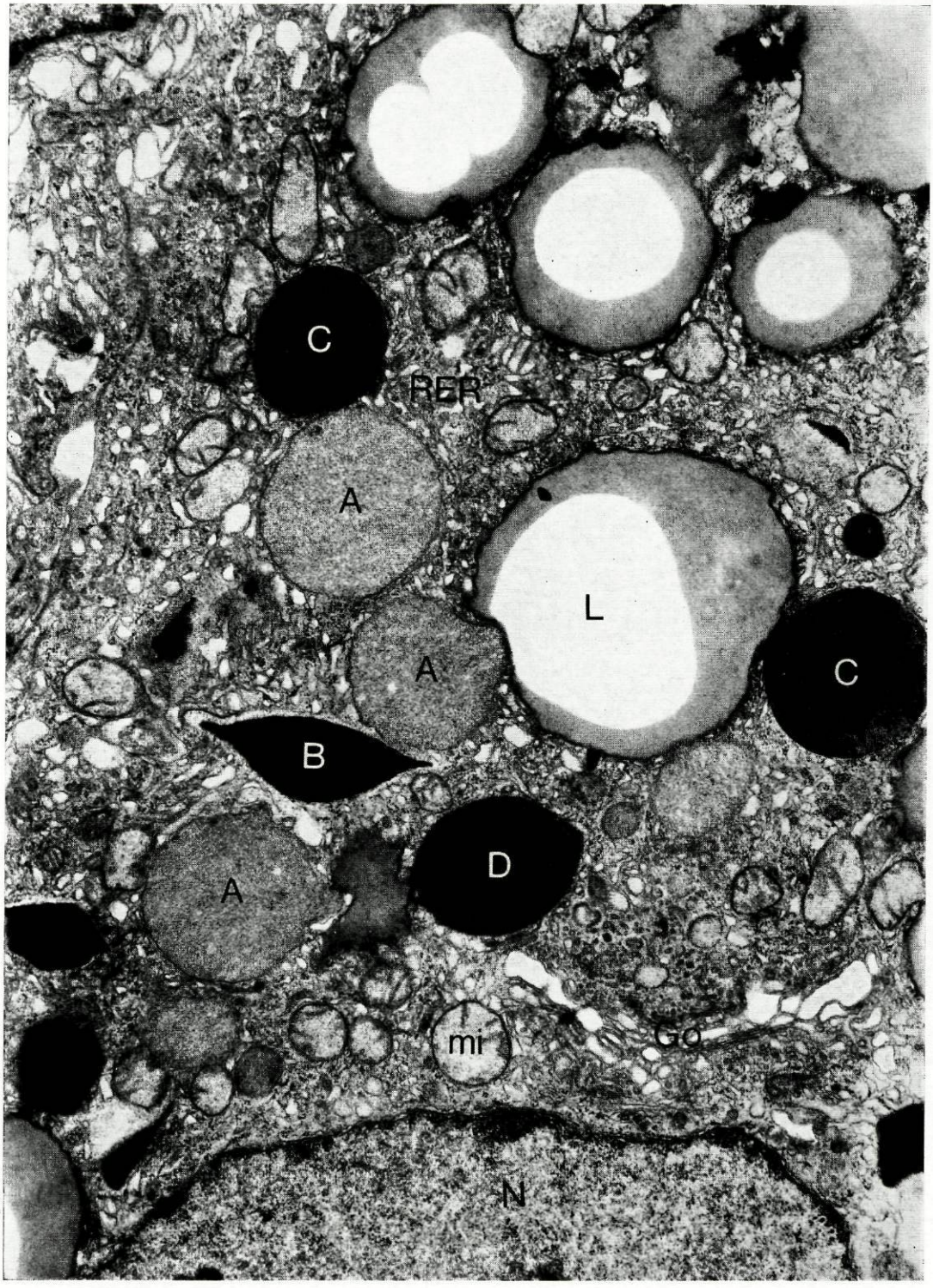
Nos ratos com menos de 3 semanas de vida, os grânulos perinucleares têm matriz clara, independentemente do sexo.

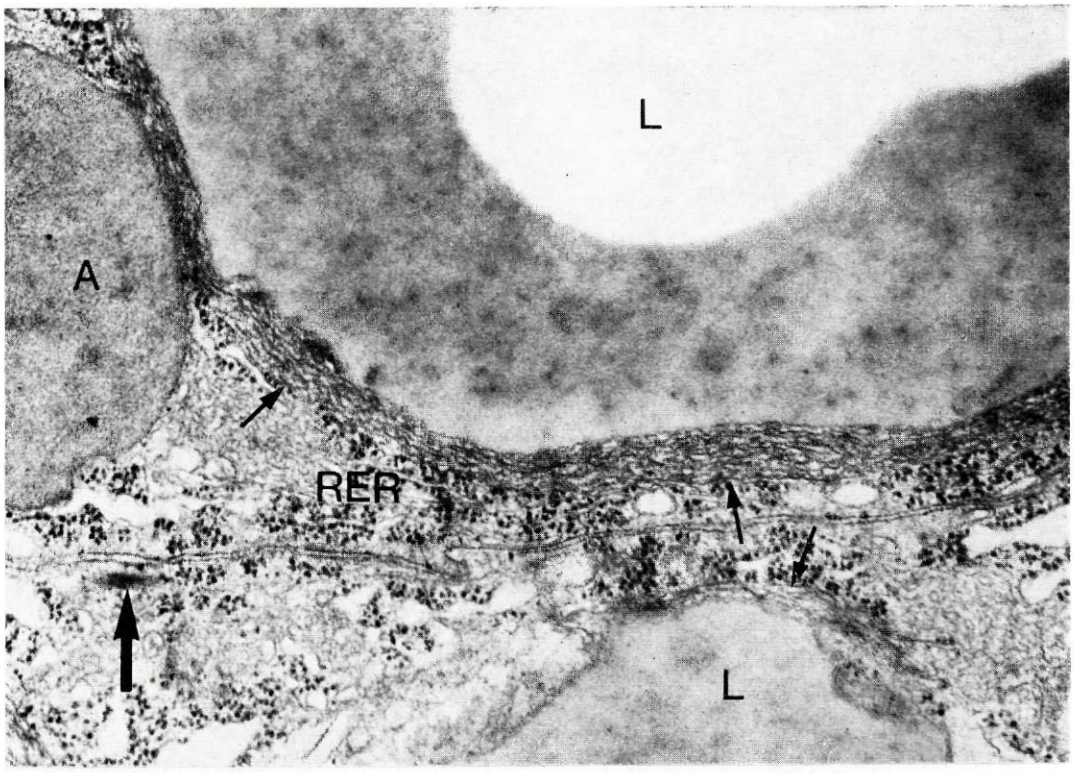
Fig. 17 — Célula diferenciada de rato fêmea adulto com grânulos perinucleares de matriz clara (A) e de matriz densa (C). Um dos grânulos claros (B) e um dos densos (D) apresentam inclusões cristalóides. As cisternas do retículo endoplásmico rugoso (RER) aparecem menos dilatadas do que nos ratos machos. 15 000 ×

Fig. 18 — Pormenor de duas células diferenciadas de rato macho adulto, mostrando gotículas lipídicas (L) rodeadas por grande número de túbulos lisos sobrepostos (setas finas), contínuos com cisternas de parede rugosa (RER). Vê-se ainda grânulo perinuclear de matriz clara (A) e pequeno feixe de tonofilamentos (seta longa) na periferia de uma das células. 32 000 ×

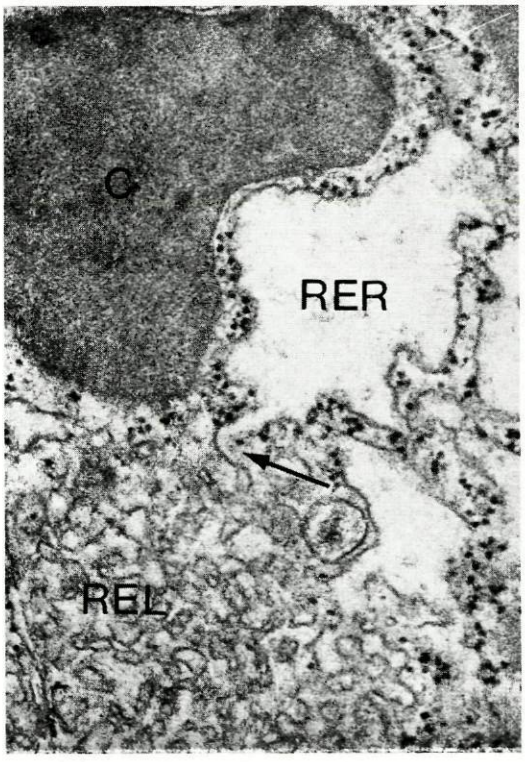
Fig. 19 — Transição (seta) entre cisterna dilatada do retículo endoplásmico rugoso (RER) e aglomerado de túbulos de parede lisa (REL). Grânulo perinuclear de matriz densa (C). 47 000 ×

Fig. 20 — Bandas claras rectilíneas (setas finas), na matriz de um grânulo denso (C). No polo superior do grânulo é bem aparente a membrana trilaminar que o reveste (seta longa). 30 000 ×

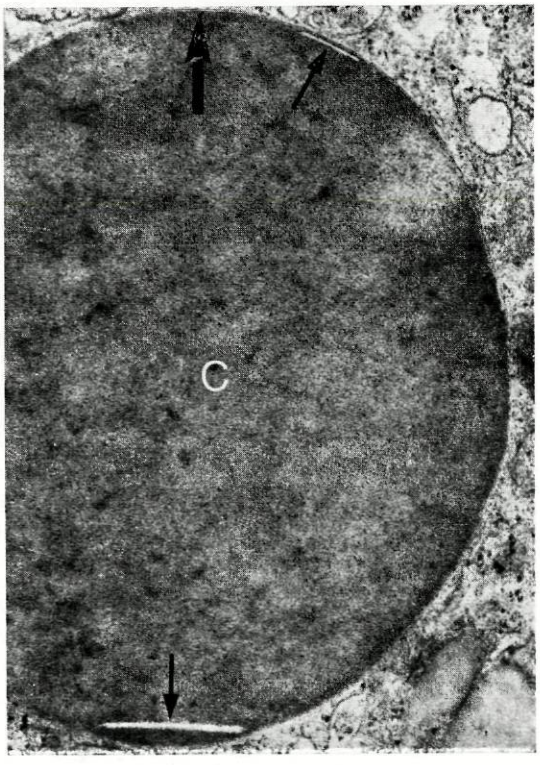

C
RER
A
L
A
C
B
D
A
mi
GO
N



18



19



20

Células completamente diferenciadas

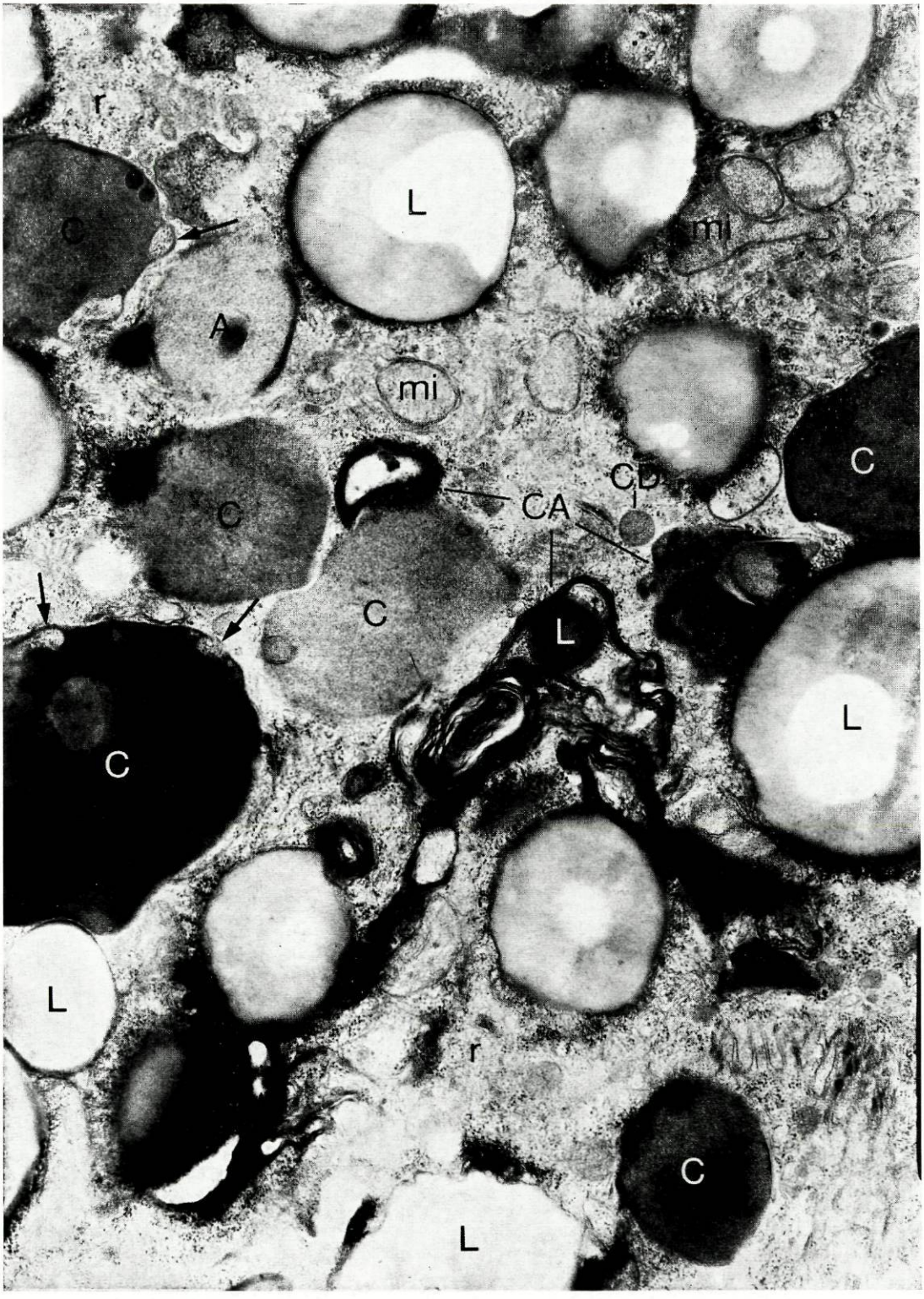
Ocupam o interior das porções média e proximal dos túbulos glandulares (Figs. 2 e 4). São as maiores células da glândula (com cerca de 38 μm de diâmetro). É grande o número de gotículas sudanófilas [2,98 ± 0,07 μm (D.P.M.) de diâmetro] e de grânulos perinucleares [2,72 ± 0,08 μm (D.P.M.) de diâmetro] (medidas de 200 gotículas lipídicas e de 200 grânulos de glândulas de ratos machos adultos).

Ao microscópio electrónico, os ribosomas são em menor número do que nas células precedentes (Fig. 21). O retículo endoplásmico rugoso é menos desenvolvido e compõe-se de cisternas pouco dilatadas. Os elementos do retículo endoplásmico liso raramente se dispõem em aglomerados de tubos intercomunicantes ou envolvem as gotículas lipídicas. Os aparelhos de Golgi são escassos; os corpos densos (Fig. 21), abundantes. O número das mitocôndrias parece inalterado.

As gotículas lipídicas e os grânulos perinucleares preenchem grande parte do citoplasma em detrimento das áreas anteriormente ocupadas pelos organelos (Fig. 21). A maioria das gotículas lipídicas apresenta-se com o interior parcialmente extraído. Os grânulos perinucleares, muito numerosos, são quase todos densos e só excepcionalmente se distinguem cristalóides no seu interior. Todavia, em cortes semifinos corados pelo Negro de Sudão B e em cortes de parafina corados pela hemateína-eosina, os cristalóides patenteiam-se em grande número.

Dispersos no citoplasma observam-se, ocasionalmente, formações membranosas de forma irregular, por vezes do tipo das figuras mielínicas, a rodear áreas contendo ribosomas, gotículas lipídicas ou detritos celulares (Fig. 21, *CA*).

Fig. 21 — Célula completamente diferenciada de rato macho adulto. No citoplasma avultam gotículas lipídicas (L) e grânulos perinucleares (A e C), alguns dos quais apresentam membranas invaginadas (setas). Os organelos são escassos. No centro da figura vêem-se corpos autofágicos (CA) com membranas espiraladas rodeando áreas com ribosomas, detritos celulares e uma pequena gotícula lipídica (L). 16 800 ×


r
L
mi
C
A
mi
C
CA
CD
C
C
L
C
L
L
r
C
L

Células em desagregação

Em cortes corados pela hemateína-eosina, estas células apresentam núcleo retraído, fortemente basófilo; o citoplasma é muito vacuolizado e os contornos celulares mal definidos. Nas zonas não vacuolizadas do citoplasma, vêem-se grânulos eosinófilos, muitos deles não perinucleares, alguns francamente mais volumosos do que nas células anteriores (com 12 μm de diâmetro).

O estudo ultrastrutural permitiu individualizar as extensas alterações que afectam os vários componentes das células. A continuidade da membrana citoplasmática aparece interrompida em alguns pontos (Fig. 22).Ocasionalmente, surgem desmosomas aderentes a segmentos destacados da membrana. A membrana perinuclear apresenta também soluções de continuidade (Fig. 23); a cromatina torna-se menos electrono-densa e tende a distribuir-se uniformemente no suco nuclear (Figs. 22 e 23), embora afastando-se ligeiramente da face interna da membrana perinuclear (Fig. 23). Mais tarde, transforma-se numa massa granulosa homogénea, não muito densa, que preenche completamente o núcleo. São frequentes os nucléolos em forma de anel e compactos (Busch e Smetana, 1970).

As gotículas lipídicas, grandes e numerosas, conservam o aspecto habitual (Figs. 22, 23, 25-27). Todavia, surgem algumas gotículas de volume excepcional com restos de citoplasma no interior (Fig. 26). Os grânulos perinucleares são quase todos de matriz densa e não se distinguem cristalóides (Figs. 24-27). Observam-se, por vezes, grânulos mais volumosos, de contorno irregular, com a membrana limitante separada da matriz (Fig. 22).

O resto do citoplasma caracteriza-se pela presença de numerosos corpos vesiculares, limitados por membrana, geralmente de pequenas dimensões (Fig. 22). Há-os de diversos tipos. Alguns contêm grupos de ribosomas livres ou apensos à face interna de outra membrana contida no interior da vesícula (Figs. 24 e 25, *CA1)*. Na realidade, estes corpos são constituídos

por cisternas dilatadas do retículo endoplásmico, com parte da membrana envolvente invaginada (Fig. 91). Outros, igualmente pequenos, apenas contêm membranas no interior ou uma massa densa heterogénea (Fig. 24, *CA2)*. Um terceiro tipo de corpos vesiculares, um pouco maiores, contém materiais densos e heterogéneos onde se distinguem ainda ribosomas (Figs. 25 e 27, *CA3)*. Finalmente, observam-se corpos vesiculares grandes, com múltiplas assentadas de membranas à periferia e o interior cheio de materiais citoplasmáticos diversos, em que se podem distinguir, por vezes, ribosomas livres e cisternas alteradas do retículo endoplásmico (Figs. 25 e 27, *CA4)*. São habituais imagens sugestivas da formação destes corpos autofágicos à custa de membranas do aparelho de Golgi (Fig. 27).

Parece tratar-se, em todos estes casos, de corpos autofágicos que preenchem a maior parte do citoplasma não ocupado pela secreção lipídica e proteica (Fig. 22). Há ainda, no entanto, pequenas áreas de hialoplasma entre estes elementos onde se

---

Figs. 22 a 27 — Imagens de células em desagregação holócrina.

Fig. 22 — Aspecto de conjunto de uma célula em desagregação. Observam-se numerosas gotículas lipídicas (L), grânulos perinucleares, alguns volumosos e angulosos com membrana limitante separada e inúmeros corpos autofágicos (CA) de diversos tipos. As setas longas apontam zonas de rotura da membrana celular. Na parte inferior da figura, nota-se sebo (S) constituido pelos elementos visíveis na célula em desagregação e por alguns cristalóides livres (setas finas). 8 100 ×

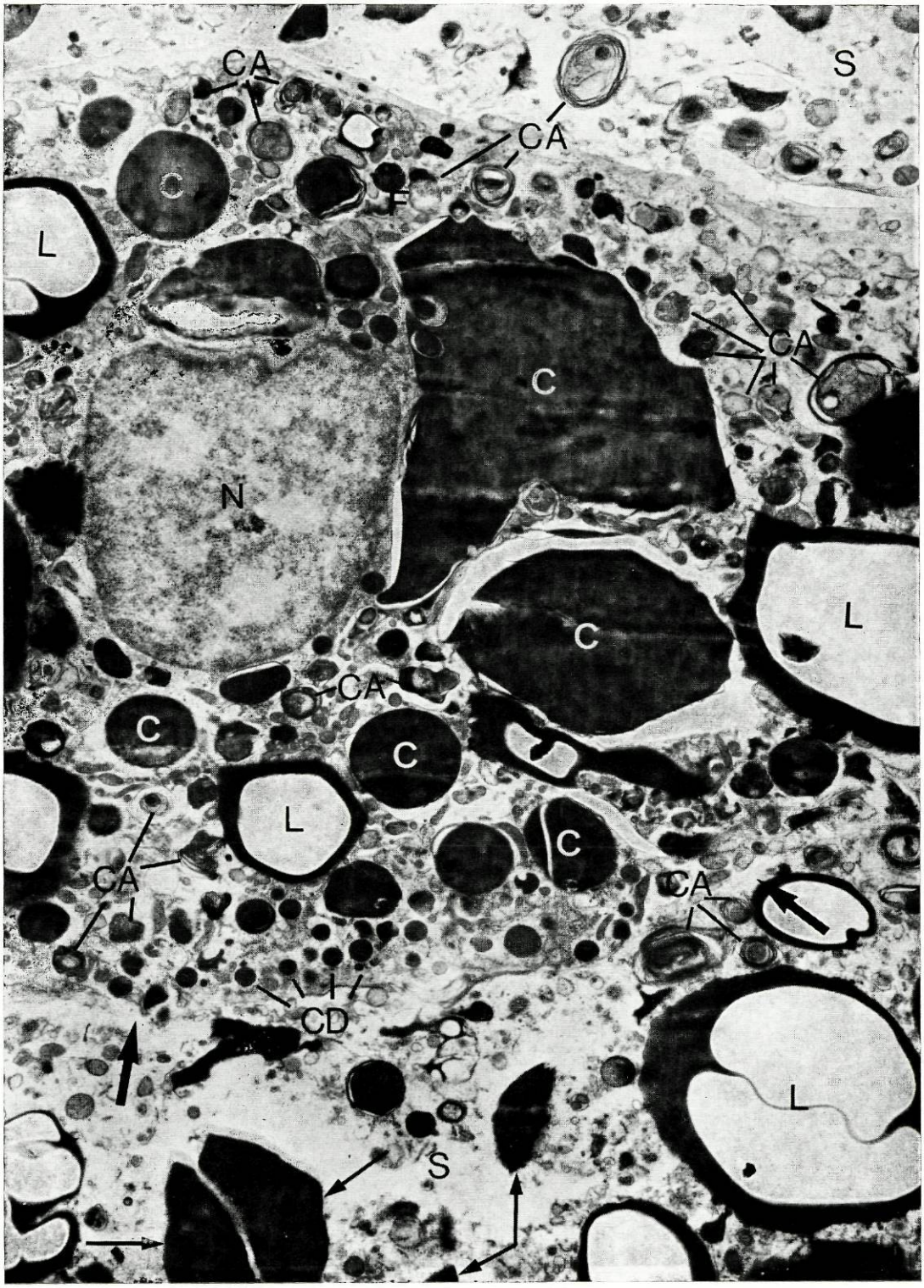
Fig. 23 — Núcleo de célula em desagregação. A membrana perinuclear está interrompida (setas) e afastada (*) das massas cromatínicas pouco densas. 15 000 ×

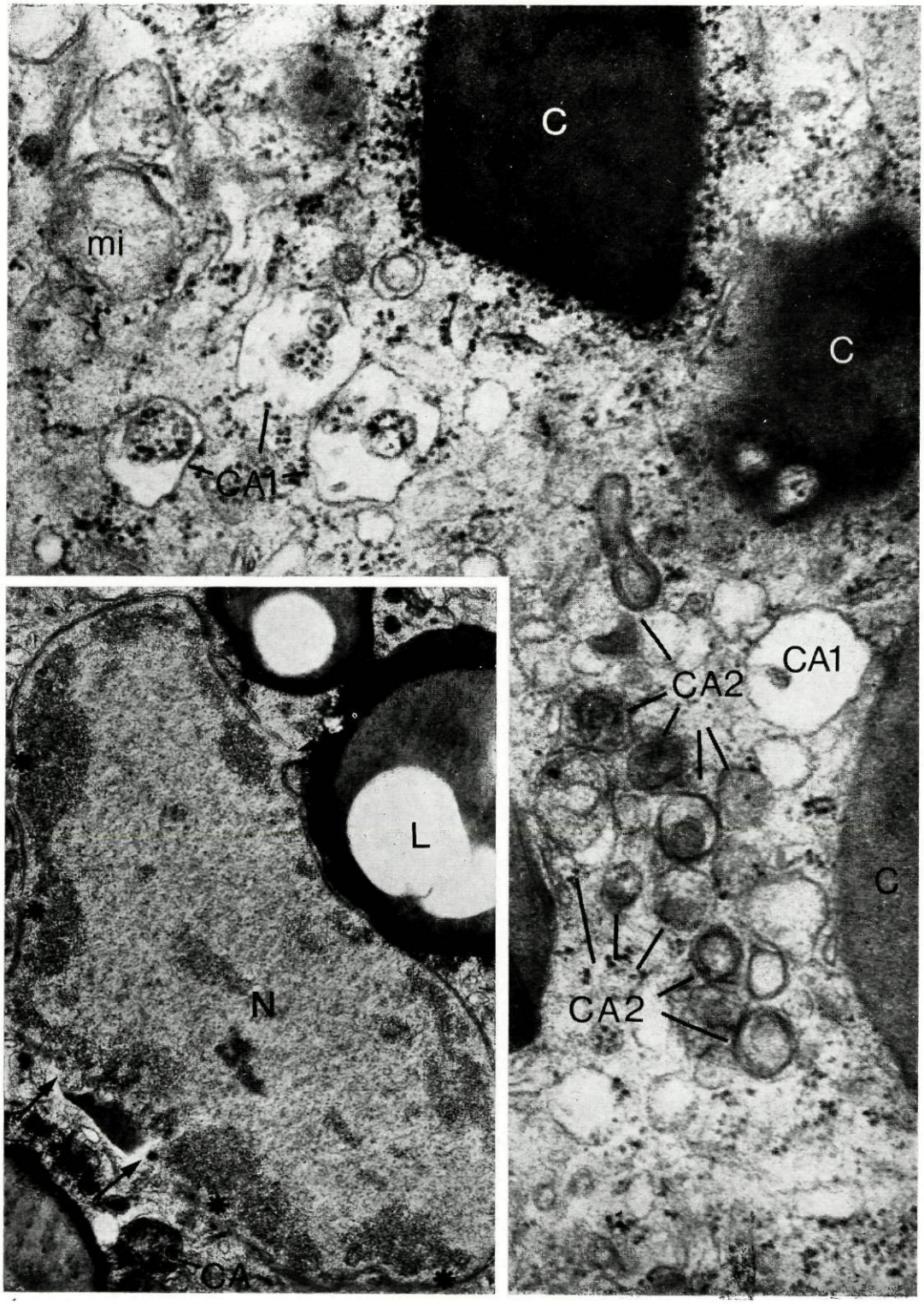
Fig. 24 — Citoplasma de célula em desagregação evidenciando numerosos corpos autofágicos contendo vesículas com ribosomas (CA1) e corpos autofágicos com membranas no interior (CA2). 48 600 ×

Fig. 25 — Corpos autofágicos com vesículas e ribosomas idênticos aos da figura anterior (CA1), corpo autofágico de conteúdo denso (CA3) e outro, mais volumoso, com membrana multilamelar na periferia (CA4). 28 000 ×

Fig. 26 — Volumosa gotícula lipídica (L) com restos citoplasmáticos no interior e numerosos corpos autofágicos do tipo CA3. 16 200 ×

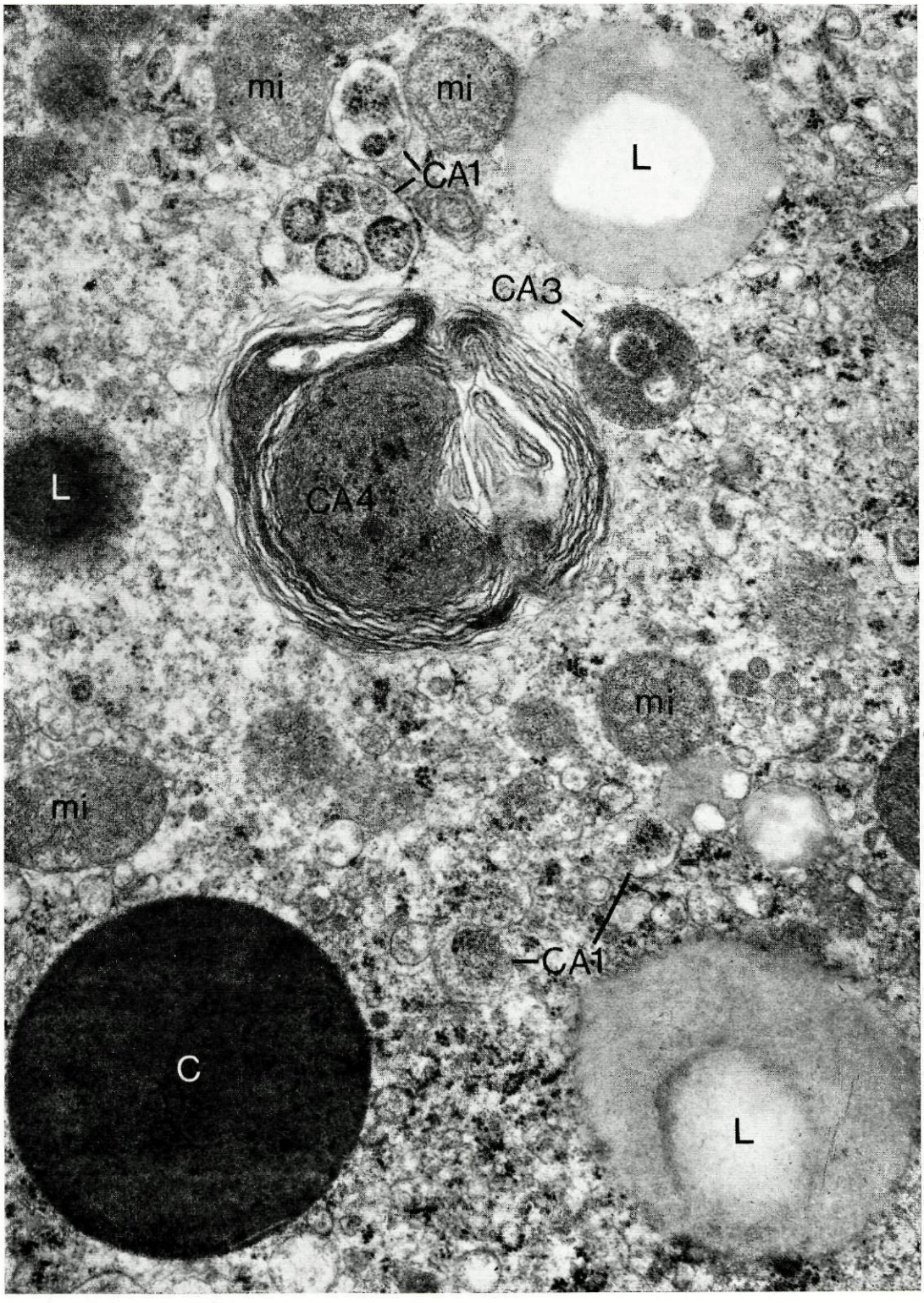
Fig. 27 — Corpos autofágicos dos tipos CA3 e CA4, gotículas lipídicas (L), grânulos perinucleares (A e C) e um pequeno corpo denso (CD). A seta indica imagem sugestiva de formação de um corpo autofágico a partir de cisternas achatadas de aparelho de Golgi (Go). 17 400 ×

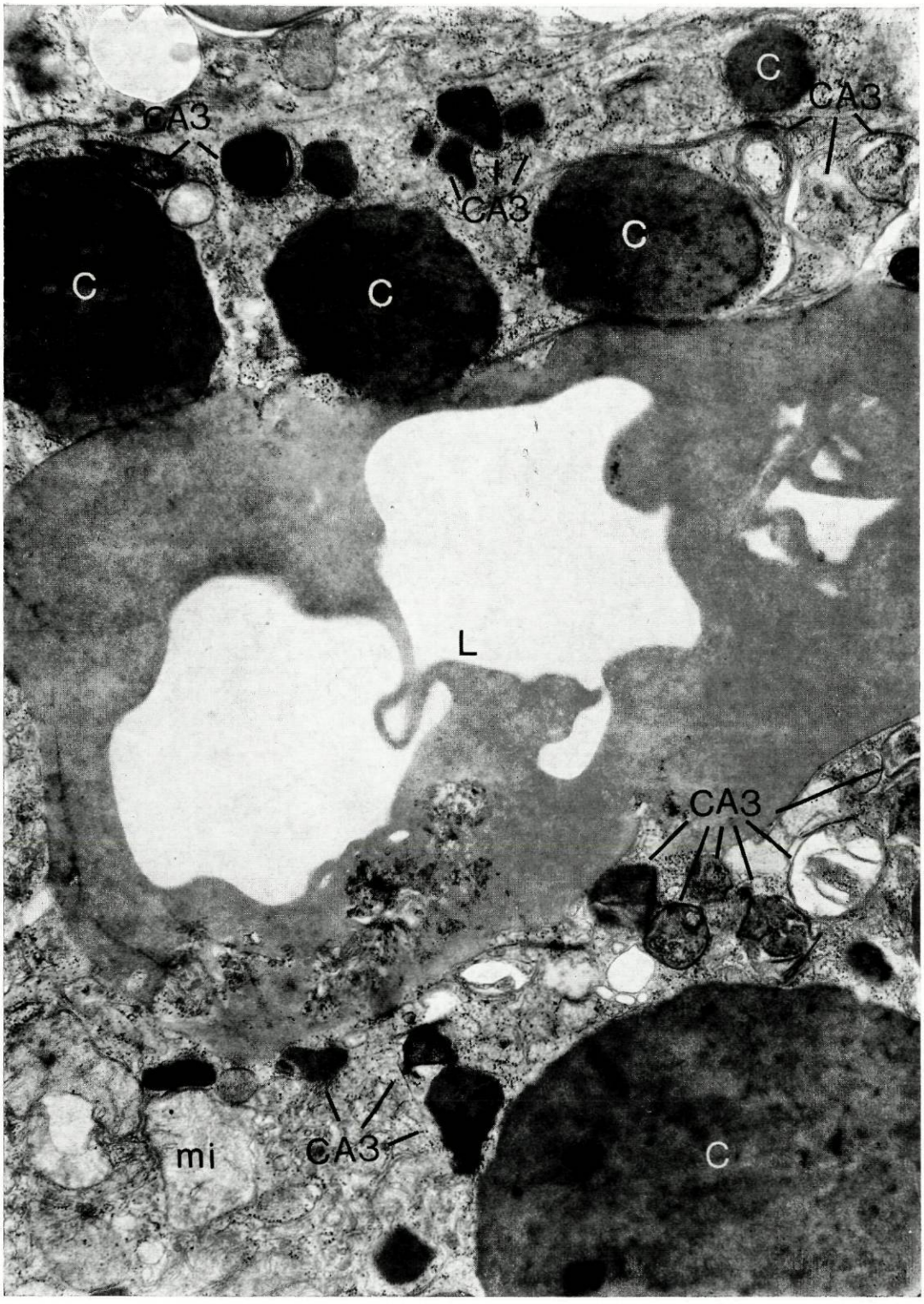

CA
CA
S
C
F
L
CA
C
N
C
L
CA
C
C
L
C
CA
CA
CD
L
S

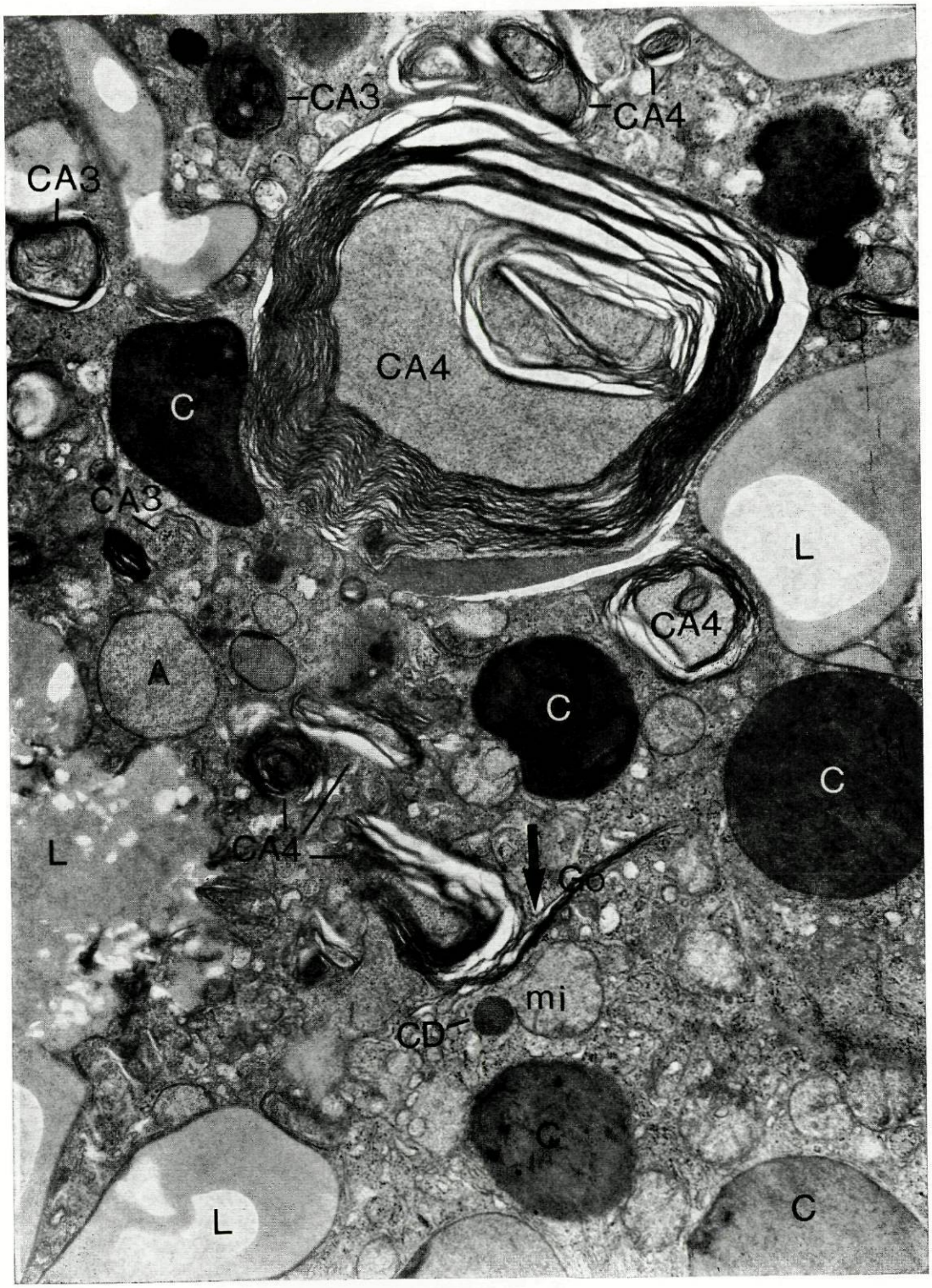


23

24


mi
mi
CA1
L
CA3
CA4
L
mi
mi
CA1
C
L


CA3
CA3
CA3
C
C
C
C
C
L
CA3
CA3
mi
C


CA3
CA4
CA3
CA4
C
CA3
L
CA4
A
C
C
L
CA4
Co
mi
CD
C
L
C

distinguem ribosomas livres e mitocôndrias de aspecto praticamente normal.

Sebo

O produto da secreção, o sebo, ocupa o lume dos canais excretores secundários e principal. Tem, no microscópio de luz, o aspecto de uma massa amorfa eosinófila na qual se destacam núcleos retraídos muito basófilos, gotículas lipídicas e grandes massas cristalóides incolores (Figs. 28 e 36). Estas resultam da justaposição de cristalóides individuais (Figs. 29 e 30). No

---

Fig. 28 — Sebo (S) no lume de canal excretor principal. Observam-se grandes massas cristalóides (setas pequenas) e gotículas lipídicas arredondadas (setas curtas) incolores, no seio de material amorfo corado de róseo. A seta longa aponta núcleos retraídos, basófilos. Fixação: líquido de Helly. Corte de parafina. Coloração: hemateína-eosina. 102 ×

Fig. 29 — Sebo. Gotículas lipídicas incolores (*) e cristalóides livres de cor azul escuro (setas curtas). No centro da figura destaca-se grande massa cristalóide (X). Fixação: formol-cálcio de Baker. Corte de congelação. Coloração: método de Baker. 1 200 ×

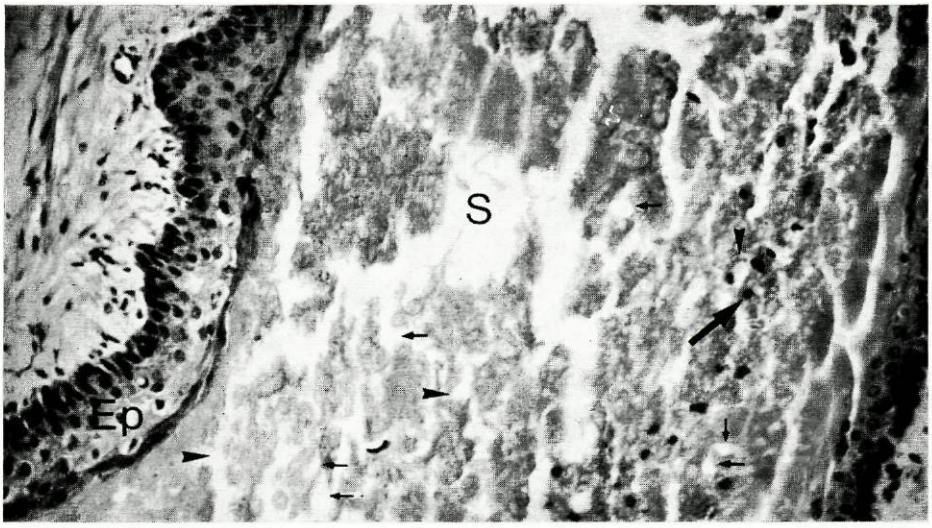
Fig. 30 — Aglomerados de cristalóides incolores formando grandes massas cristalóides do sebo (setas longas). Notar linhas de junção entre os cristalóides justapostos. As gotículas lipídicas (setas curtas) apresentam centro incolor e halo periférico corado de preto. Fixação: tetróxido de ósmio. Corte de 1 μm de espessura. Coloração: Negro de Sudão B. 1 140 ×

Fig. 31 — Corte transversal de canal excretor principal (1) mostrando predomínio de grandes massas cristalóides, coradas de azul escuro, na periferia do lúmen. Há canais excretores secundários cortados longitudinalmente (2) e numerosos ácinos (3). O epitélio dos canais (Ep) e o tecido conjuntivo interacinoso (TC) aparecem incolores. Os ácinos contêm grânulos corados de preto e de azul escuro. Fixação: formol-cálcio de Baker. Corte de congelação. Coloração: método de Baker. 54 ×

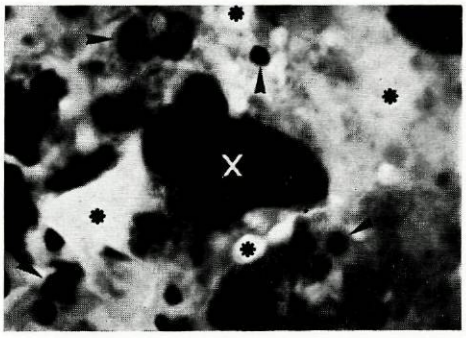
Fig. 32 — Ultrastrutura do sebo. Notar grandes massas cristalóides (setas longas), gotículas lipídicas (L), corpos autofágicos limitados por membranas concêntricas (CA) e numerosos detritos celulares. Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 11 200 ×

Fig. 33 — Grande massa cristalóide do sebo formado por três cristalóides adjacentes (1, 2 e 3). Observar as linhas de junção (setas) entre os cristalóides. Fixação: glutaraldeído. Coloração idêntica à da figura anterior. 21 000 ×

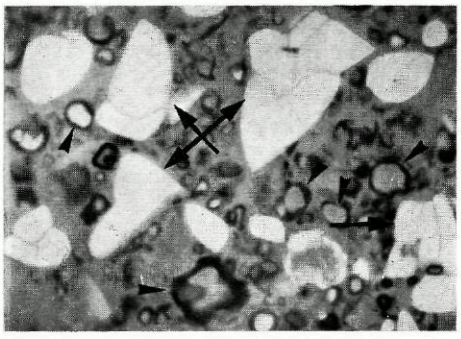
Fig. 34 — Grande massa cristalóide do sebo, fortemente ampliada, mostrando aspecto granitado e ausênsia de membrana de revestimento (setas). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração idêntica à da figura 32. 232 000 ×



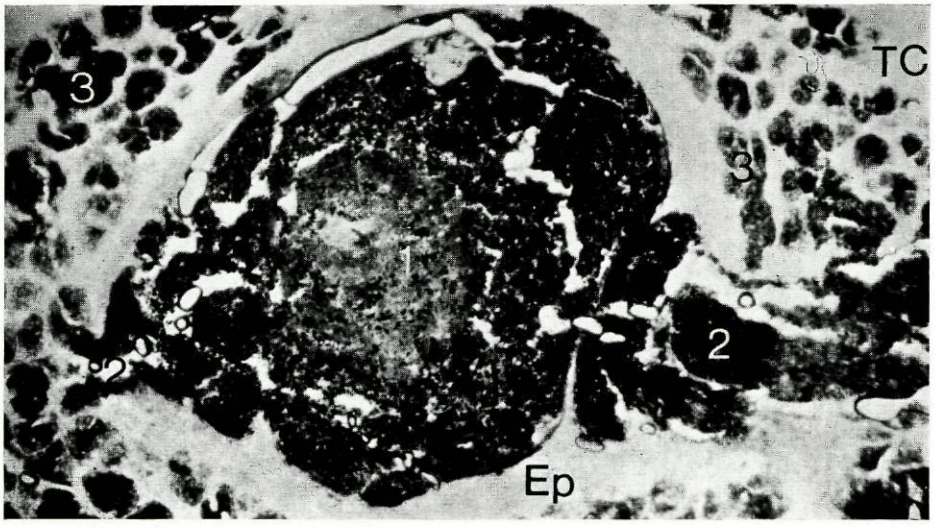
28



29

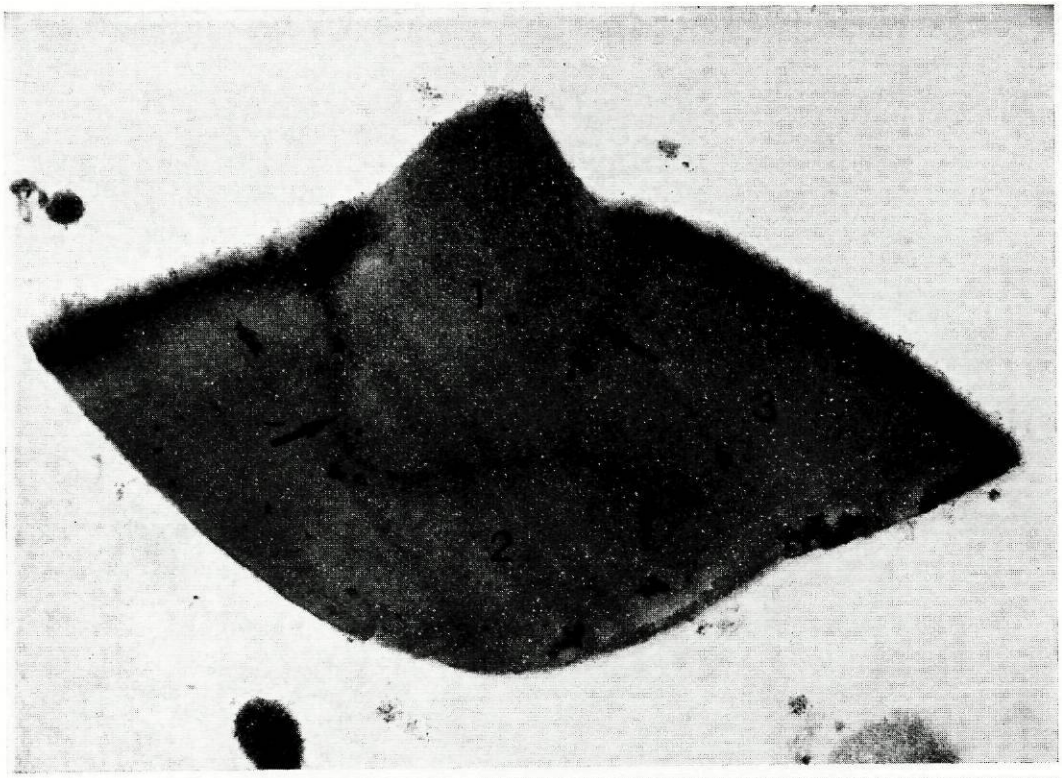


30

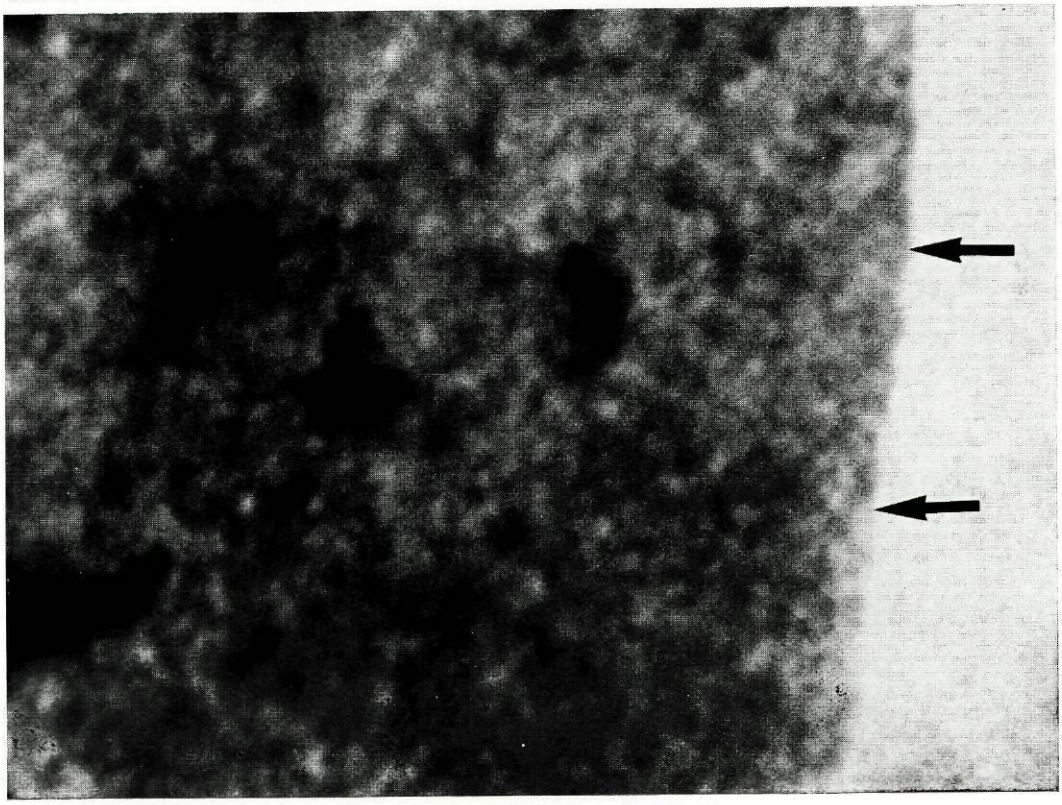


31


CA
L
CA
CA
L



33



34

lume do canal excretor principal, as grandes massas cristalóides predominam à periferia do sebo (Fig. 31).

Estes componentes objectivam-se em maior detalhe ao microscópio electrónico. As gotículas lipídicas e os corpos autofágicos descritos nas células em desagregação, surgem agora inteiramente livres num fundo pouco denso, finamente pontuado de pequenas partículas (Fig. 32). Todavia, os corpos autofágicos apresentam-se mais frequentemente limitados por membranas concêntricas que lhes preenchem também a maior parte do interior (Fig. 32, *CA*). A justaposição dos cristalóides livres, que leva à formação das grandes massas cristalóides, observa-se bem nos cortes ultrafinos, duplamente corados, de peças fixadas em glutaraldeído (Fig. 33). Nestas condições, distinguem-se perfeitamente as linhas de junção dos cristalóides agrupados. Ampliações elevadas (Fig. 34) permitem asseverar, ainda, que as grandes massas cristalóides não são revestidas por membrana.

CITOQUÍMICA DAS CÉLULAS SECRETORAS

A — Componentes do material secretório

Microscopia de luz

PAS — Todos os tipos de células em diferenciação contêm grânulos predominantemente perinucleares corados de vermelho, alguns dos quais apresentam um ou mais cristalóides incolores no interior (Fig. 37). Além destes, vêem-se gotículas incolores (Fig. 37). No sebo há um fundo avermelhado difuso no qual se destacam grandes massas cristalóides e gotículas volumosas, não coradas (Fig. 38).

Ferro coloidal — Unicamente os grânulos dos mastócitos e o estroma conjuntivo da glândula coram fortemente de azul.

Reacção do tetrazónio acoplado de Danielli — Os grânulos perinucleares coram de vermelho-acastanhado, sendo possível,

nalguns deles, distinguir cristalóides mais intensamente corados do que a matriz (Fig. 39). No sebo observam-se grandes massas cristalóides (Fig. 40) mais vivamente coradas do que o fundo amorfo.

Reacção do DDD de Barrnett e Seligman — Os grânulos perinucleares e as grandes massas cristalóides do sebo coram de amarelo-torrado. Os cristalóides não se distinguem da matriz. O tratamento prévio pelo ácido iodoacético ou pela maleimida não altera o resultado. Nos cortes tratados pelo ácido tioglicólico, os grânulos perinucleares, matriz e cristalóides, e as grandes massas cristalóides do sebo coram de vermelho-acastanhado (Figs. 41 e 42). O tratamento prévio pelo ácido iodoacético ou pela maleimida provoca diminuição da coloração.

Negro de Sudão B — Os grânulos perinucleares, os cristalóides intragranulares e as grandes massas cristalóides do sebo permanecem incolores (Figs. 43 e 44). Em contrapartida, nas células basais, em diferenciação e em desagregação, observam-se numerosos outros grânulos corados de azul escuro (Figs. 43 e 44) cujo volume aumenta com o grau de diferenciação celular e é máximo no sebo (Fig. 45). A sudanofilia desaparece no material submetido à extracção pela acetona.

Oil red O — Com este lisocromo os resultados são os mesmos.

Hemateína ácida de Baker — Nas células em início de diferenciação dos ratos adultos, os critalóides dos grânulos coram de azul escuro (Fig. 46). A matriz que os rodeia e a que preenche totalmente a maioria dos restantes grânulos surge amarelo-palha (Fig. 46). Nos animais de 2 semanas, todos os grânulos são desta tonalidade. Nas células diferenciadas, completamente diferenciadas e em desagregação, a maioria dos grânulos cora totalmente de azul escuro ou de preto e os cristalóides não se distinguem no seu interior. No sebo, as grandes massas cristalóides aparecem azul escuro (Fig. 47). Os grânulos sudanófilos não coram por este método (Fig. 46). A coloração foi negativa após tratamento pela piridina (Fig. 48).

OTAN — Nas células em início de diferenciação, a maioria dos grânulos perinucleares é incolor enquanto nas células em fase mais adiantada de diferenciação quase todos surgem tingidos de vermelho-alaranjado (Fig. 72). Os cristalóides não se distinguem da matriz. As grandes massas cristalóides do sebo exibem a mesma coloração. Há, porém, além destes, numerosos grânulos negros, de pequenas dimensões, nas células basais e outros, maiores, também negros, nas células em diferenciação (Fig. 72) e no sebo. Tal como no caso dos grânulos sudanófilos, o seu volume aumenta à medida que a diferenciação progride. O tratamento pela acetona retira colorabilidade apenas aos grânulos negros (Fig. 73). No **método de OTAN modificado para a esfingomielina,** o hidróxido de sódio descora a matriz dos

---

Fig. 35 — Células diferenciadas com grânulos perinucleares eosinófilos (setas pequenas) e gotículas lipídicas incolores (*). Na matriz de um dos grânulos observa-se cristalóide não corado (seta grossa). Fixação: formol tamponado de Lillie. Corte de parafina. Coloração: hemateína-eosina. 2 100 ×

Fig. 36 — No sebo vêem-se grandes massas cristalóides incolores (setas) rodeadas de material amorfo cor de rosa e gotículas lipídicas (*) não coradas. Fixação e coloração como na figura anterior. 750 ×

Fig. 37 — Células em desagregação evidenciando grânulos perinucleares de matriz corada de vermelho. Num dos grânulos distingue-se cristalóide incolor (seta). Gotículas lipídicas (*) não coradas. Fixação: formol a 4 p. 100 (1 semana). Corte de parafina. Coloração: PAS. 2 250 ×

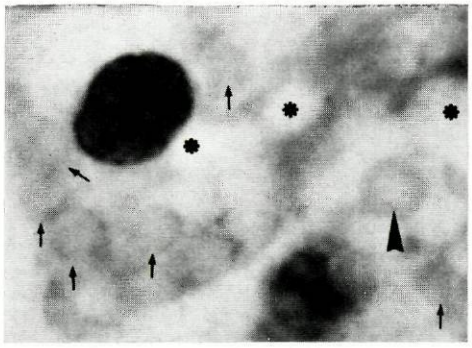
Fig. 38 — No sebo observam-se grandes massas cristalóides (setas) e gotículas lipídicas (*) incolores entre material amorfo de cor vermelha. Fixação e coloração como na figura anterior. 1 800 ×

Fig. 39 — Células em desagregação com grânulos perinucleares (matriz e cristalóides) corados de vermelho-acastanhado; em dois deles destacam-se cristalóides com coloração mais intensa (setas). Fixação: líquido de Carnoy. Corte de parafina. Coloração: reacção de Danielli. 1 080 ×

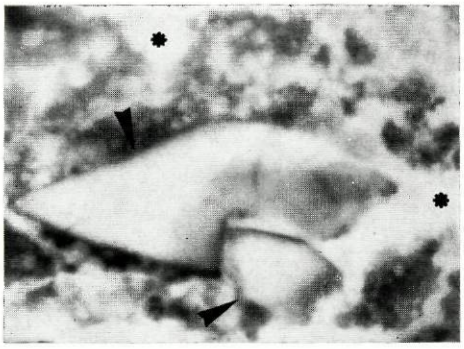
Fig. 40 — Grandes massas cristalóides do sebo de cor vermelha-acastanhada no lume de canal excretor secundário. Fixação e coloração como na figura anterior. 1 440 ×

Fig. 41 — Grânulos perinucleares de células em desagregação com matriz e cristalóides (setas) corados de vermelho-acastanhado. Fixação: líquido de Helly. Corte de parafina. Coloração: reacção do DDD de Barrnett e Seligman após redução pelo ácido tioglicólico. 2 250 ×

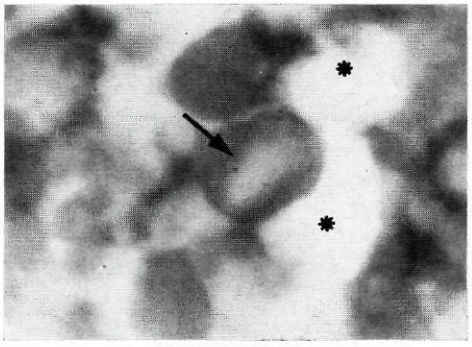
Fig. 42 — Grandes massas cristalóides do sebo (setas) e material amorfo (*) corados de vermelho-acastanhado. Fixação e coloração como na figura anterior. 2 250 ×



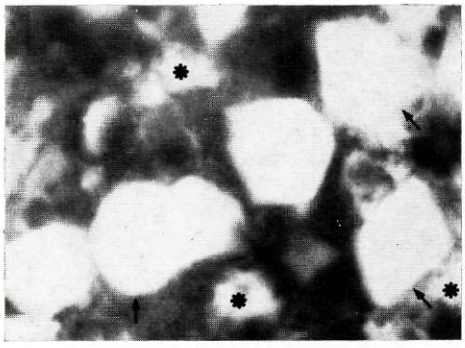
35



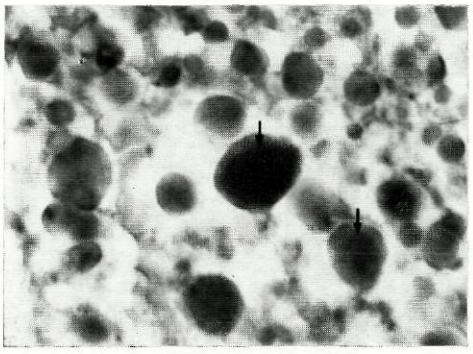
36



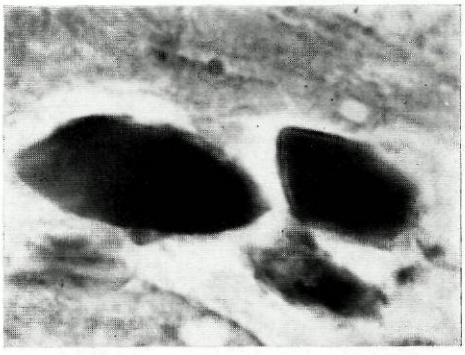
37



38



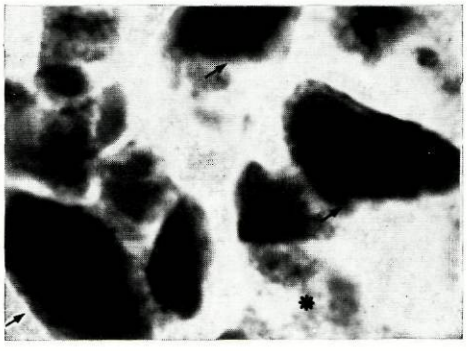
39



40



41



42

grânulos vermelho-alaranjados. A coloração das grandes massas cristalóides do sebo é, porém, exacerbada (Fig. 49).

Sulfato do azul do Nilo — No citoplasma corado de azul das células secretoras observam-se grânulos corados de róseo do mesmo tamanho dos grânulos sudanófilos (Fig. 50). Outros

---

Fig. 43 — Células em desagregação evidenciando gotículas lipídicas sudanófilas e grânulos perinucleares (*) incolores. Notar cristalóide não corado (seta) no interior de um dos grânulos. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: Negro de Sudão B (15 minutos à temperatura ambiente). 1 640 ×

Fig. 44 — No sebo observam-se gotículas lipídicas sudanófilas e grandes massas cristalóides incolores (*). Fixação e coloração como na figura anterior. 1 140 ×

Fig. 45 — Aspecto de conjunto de unidades secretores túbulo-acinosas (setas grossas) mostrando gotículas lipídicas de cor preta. O volume destas acentua-se progressivamente em direcção ao canal excretor secundário (seta longa). Fixação e coloração como na figura 43. 204 ×

Fig. 46 — Duas células em início de diferenciação com núcleos (N1 e N2) e citoplasma mostrando grânulos perinucleares de matriz clara (cor amarela-palha) sem cristalóides (*), grânulos de matriz clara (cor amarela-palha) com cristalóides densos (cor azul escuro) (setas longas) e grânulos densos (cor preta) (setas grossas) sem cristalóides aparentes. As gotículas lipídicas (X) são incolores. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método de Baker. 6 700 ×

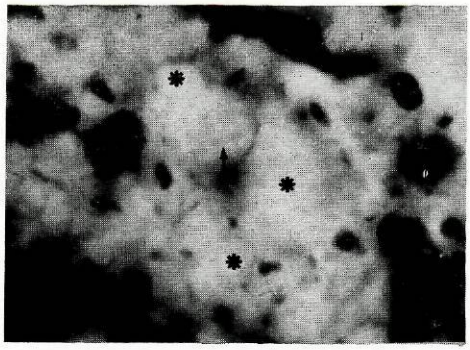
Fig. 47 — Grandes massas cristalóides do sebo intensamente coradas de azul escuro (setas). Fixação e coloração como na figura anterior 2 160 ×

Fig. 48 — Células completamente diferenciadas mostrando desaparecimento da cor preta dos grânulos perinucleares após tratamento pela piridina. No lugar destes observam-se vacúolos incolores a rodear o núcleo (N) das células. Fixação e coloração como na figura 46. 960 ×

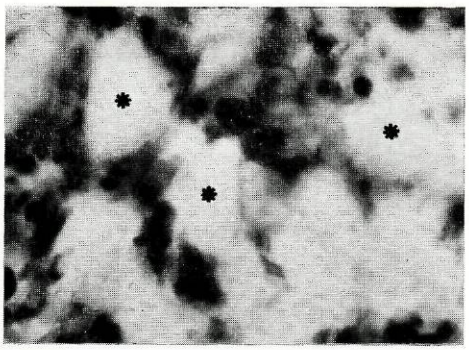
Fig. 49 — Grandes massas cristalóides do sebo de cor vermelha-romã. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método de «OTAN modificado para a esfingomielina» de Adams e Bayliss (1963). 1 440 ×

Fig. 50 — Células em desagregação com gotículas lipídicas cor-de-rosa (setas pequenas) e grânulos perinucleares incolores (*) entre áreas irregulares de hialoplasma corado de azul (setas grossas). Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: sulfato do azul do Nilo. 720 ×

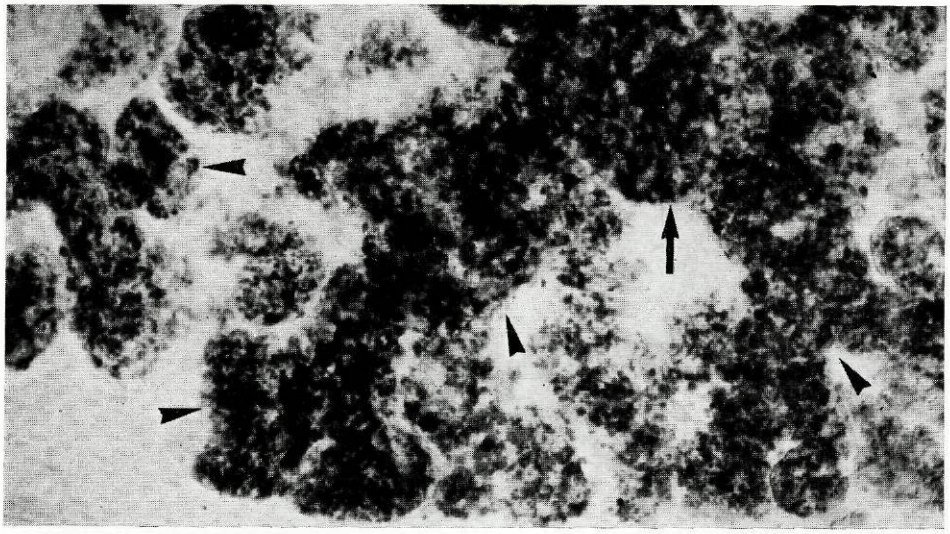
Fig. 51 — Corte transversal de canal excretor secundário. No sebo que o preenche distinguem-se grandes massas cristalóides incolores (setas pequenas), gotículas lipídicas cor-de-rosa (setas curtas) e material mais denso, de cor azul, correspondente a restos citoplasmáticos. Notar a disposição destas formações em zonas concêntricas alternadamente azuis e róseas. Na periferia do canal observam-se mastócitos (setas longas) fortemente coradas de azul escuro. Fixação e coloração como na figura anterior. 113 ×



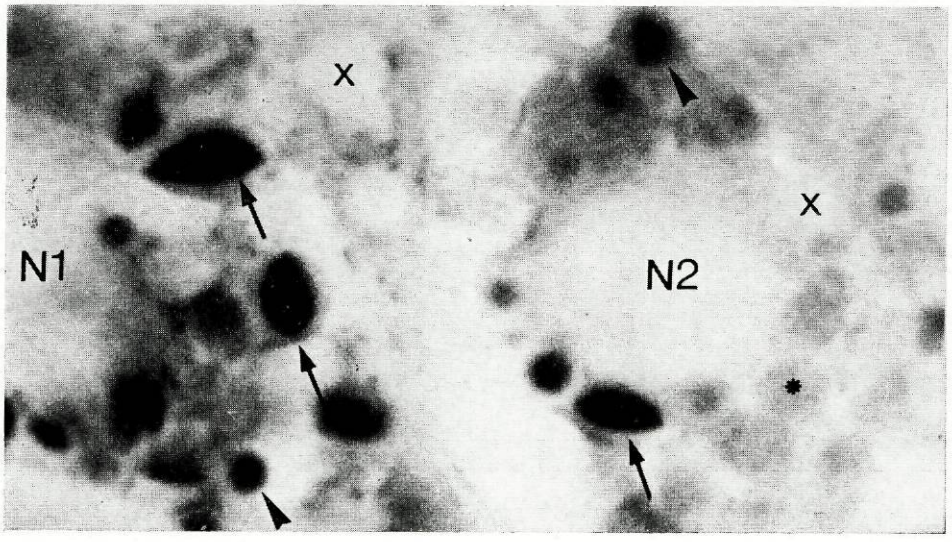
43



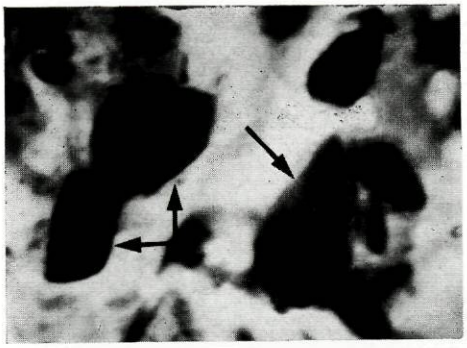
44



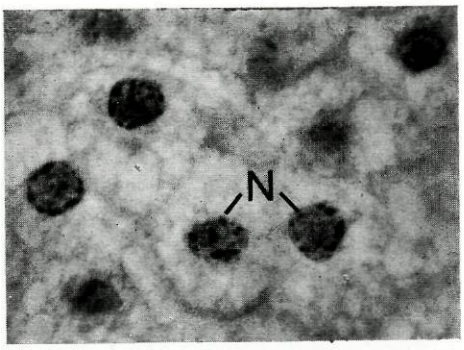
45



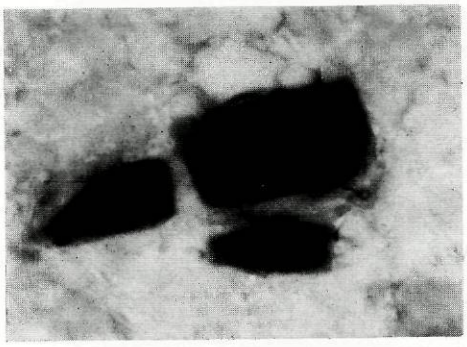
46



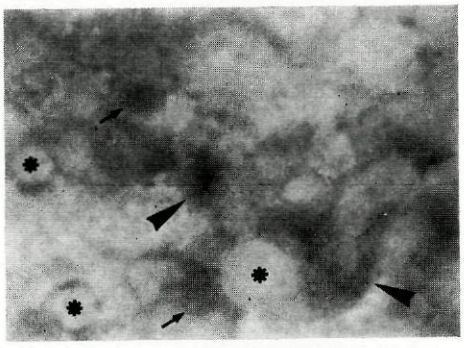
47



48



49



50



51

grânulos, incolores, são idênticos, na distribuição e no diâmetro, aos grânulos perinucleares (Fig. 50). As grandes massas cristalóides do sebo são também incolores (Fig. 51). Em cortes transversais dos canais excretores assinalam-se, frequentemente, no sebo que ocupa o lume, zonas concêntricas coradas alternadamente de azul e de róseo (Fig. 51). Os grânulos dos mastócitos coram intensamente de azul (Fig. 51).

Método de Holczinger — Resultado negativo.

O **método do ácido perclórico-naftoquinona (PAN) de Adams (1961)** e a **reacção de Schultz,** para a pesquisa do colesterol e dos seus ésteres, resultaram negativos.

Exame à luz polarizada — Verificámos ausência do fenómeno da cruz de Malta e, nomeadamente, de birrefringência.

Microscopia electrónica

Em cortes ultrafinos, não corados, de glândulas de animais adultos, fixadas apenas pelo tetróxido de ósmio, os cristalóides são densos (Fig. 52); a matriz é densa nalguns grânulos (em geral nos grânulos grandes de células em fases adiantadas de diferenciação) e clara noutros (nos de menores dimensões presentes em fases menos avançadas de diferenciação) (Figs. 52 e 53). As grandes massas cristalóides do sebo são densas (Fig. 65). O conteúdo das gotículas lipídicas é também denso (Fig. 52).

Em cortes, não corados, de peças fixadas apenas em glutaraldeído, não se distingue qualquer estrutura celular. A coloração subsequente com o acetato de uranilo, nos cortes ou em bloco, torna densos os cristalóides dos grânulos (Figs. 54 e 55), as grandes massas cristalóides do sebo (Fig. 67) e a matriz da maioria dos grânulos grandes das células em fase avançada de diferenciação (Fig. 55). As gotículas lipídicas continuam incolores (Fig. 55). A coloração dos cortes, apenas pelo citrato de chumbo, densifica moderadamente a matriz e cora, de forma

muito ténue, os cristalóides (Fig. 61) e as grandes massas cristalóides do sebo (Fig 68). As gotículas lipídicas permanecem incolores (Fig. 61).

Influência da oxidação — A actuação do peróxido de hidrogénio nas peças antes da fixação (Fig. 56) ou entre a fixação pelo glutaraldeído e o tetróxido de ósmio (Fig. 57), provoca diminuição da osmiofilia e da uranofilia dos cristalóides e das grandes massas cristalóides do sebo. Nas mesmas condições, a colorabilidade da matriz dos grânulos densos não é afectada ou mostra-se levemente diminuída. A fixação pela mistura de glutaraldeído-peróxido de hidrogénio (Peracchia e Mittler, 1972) produz efeito idêntico ao observado após oxidação pelo peróxido

---

Fig. 52 — Grânulo perinuclear de matriz clara com cristalóide denso (B), grânulo de matriz clara sem cristalóide (A) e gotícula lipídica (L) de conteúdo denso. Fixação: tetróxido de ósmio. Corte não corado. 27 200 ×

Fig. 53 — Grânulos perinucleares de matriz densa (C1 e C2) e de matriz clara (A). Fixação como na figura anterior. Corte não corado. 59 200 ×

Fig. 54 — Grânulo perinuclear de matriz clara com cristalóide denso. Fixação: glutaraldeído. Coloração: acetato de uranilo durante 20 minutos. 36 800 ×

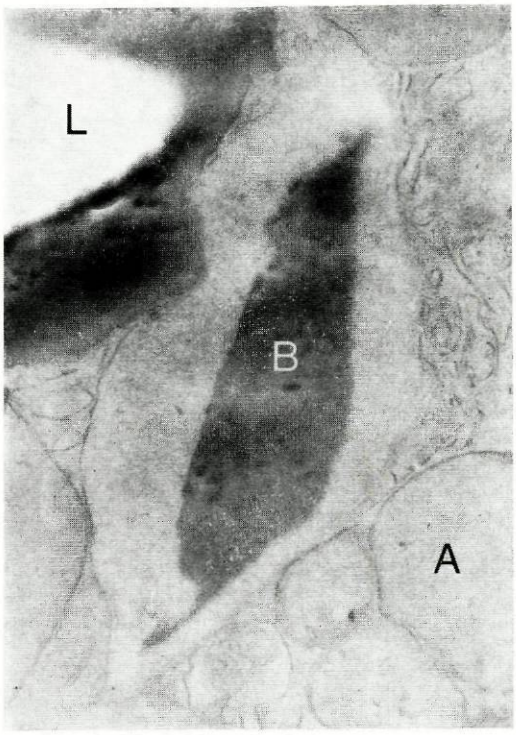
Fig. 55 — Grânulos perinucleares de matriz densa (C) e de matriz clara com cristalóide denso (B). Gotícula lipídica incolor (L). Fixação: glutaraldeído. Coloração: acetato de uranilo em bloco. 56 000 ×

Fig. 56 — Grânulo perinuclear de matriz densa com cristalóide claro. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio após imersão dos fragmentos glandulares, durante 3 minutos, num soluto de Ringer com 3 p. 100 de peróxido de hidrogénio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 43 200 ×

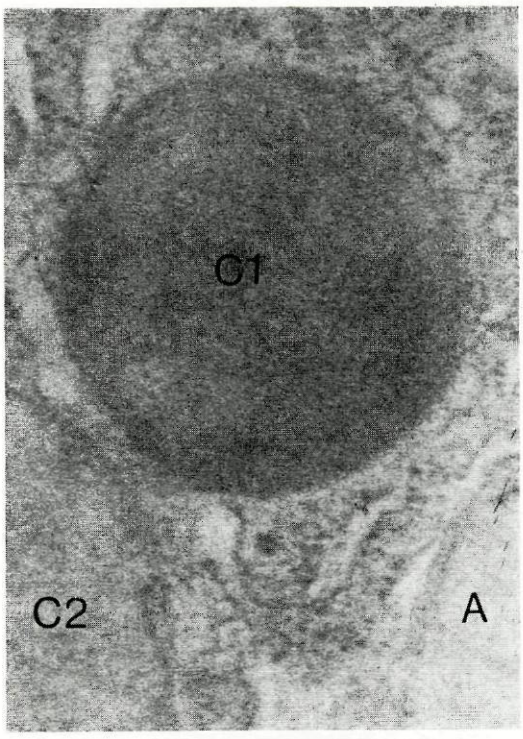
Fig. 57 — Grânulo perinuclear de matriz densa com cristalóide menos denso. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Entre os fixadores os blocos foram imersos num soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 durante 1 hora. Coloração como na figura anterior. 35 200 ×

Fig. 58 — Grânulo perinuclear de matriz densa com cristalóide incolor. A seta aponta invaginação da membrana do grânulo. Fixação: glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 56. 40 000 ×

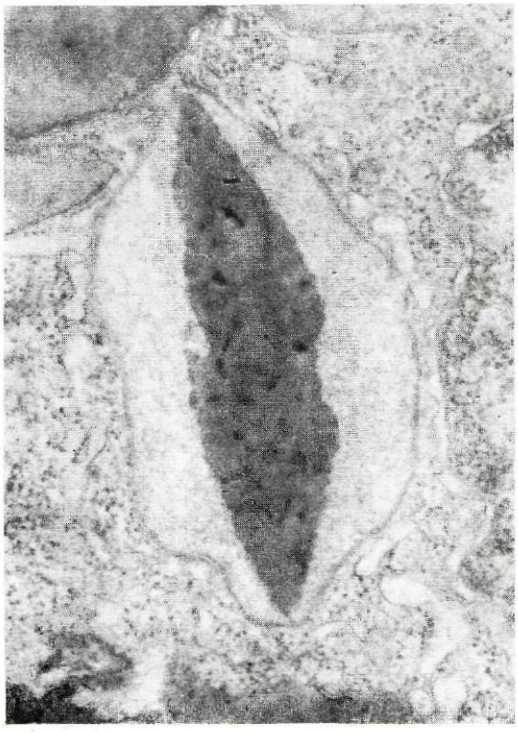
Fig. 59 — Grânulo perinuclear de matriz menos densa do que habitualmente com cristalóide incolor. Gotículas lipídicas (L) de conteúdo denso. Fixação: tetróxido de ósmio. Oxidação dos cortes por um soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 durante 12 minutos. Coloração como na figura 56. 38 400 ×



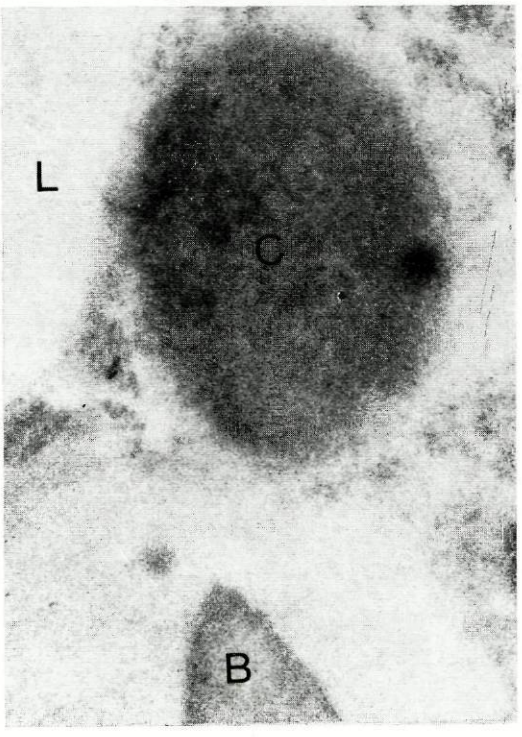
52



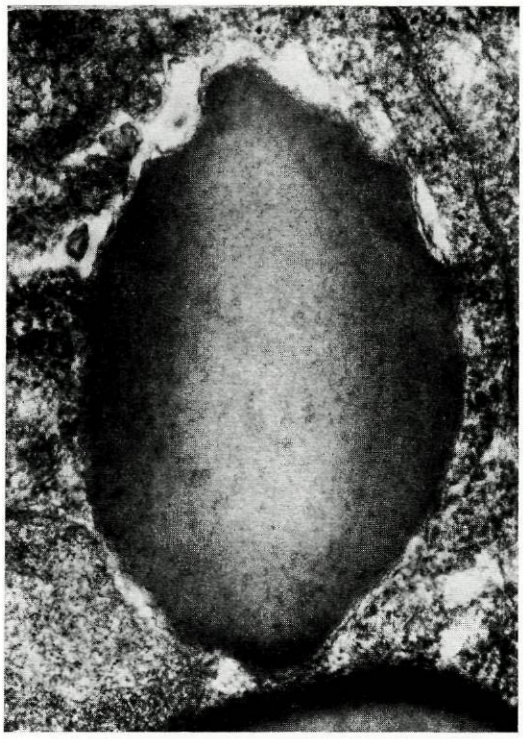
53



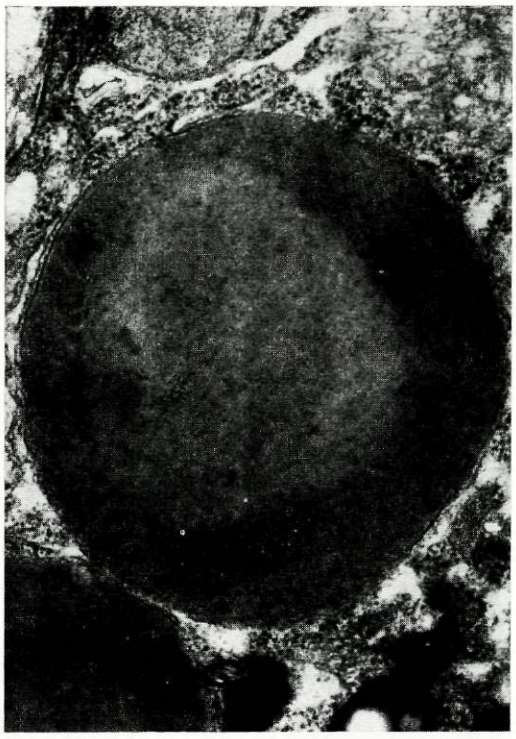
54



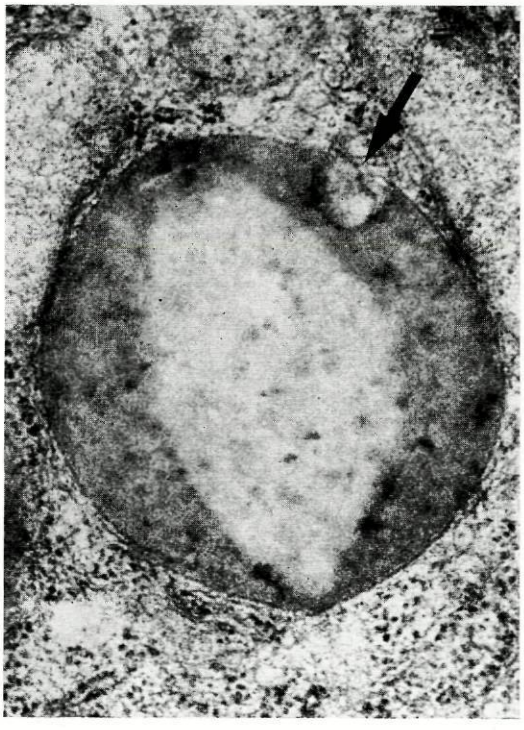
55



56



57



58



59

de hidrogénio antes da fixação (Figs. 58 e 66). O tratamento pelo peróxido de hidrogénio (10-20 minutos) ou pelo ácido periódico (20-30 minutos), de cortes ultrafinos de peças fixadas em tetróxido de ósmio (Fig. 59), anula totalmente a coloração prévia dos cristalóides pelo ósmio e impede a sua coloração subsequente pelo acetato de uranilo ou pelo tetróxido de ósmio. A matriz dos grânulos densos torna-se mais clara mas não descora completamente. A oxidação pelo peróxido de hidrogénio, durante 30 minutos, anula também totalmente a osmiação das gotículas lipídicas, as quais continuam incolores se, em seguida, corarmos os cortes pelo acetato de uranilo ou por um soluto aquoso de tetróxido de ósmio a 1 p. 100 durante, respectivamente, 30 minutos e 4 horas (Fig. 70). Uma oxidação mais curta (10-20 minutos pelo peróxido de hidrogénio) não retira a osmiação das gotículas lipídicas nem impede a sua posterior coloração (Fig. 69).

Digestão pela prónase — Em cortes ultrafinos de Epon, de tonalidade amarelo-dourado, de peças duplamente fixadas, previamente oxidados pelo peróxido de hidrogénio ou pelo ácido periódico, a prónase, em solução aquosa a 1 p. 100, extrai a matriz dos grânulos após 6 horas de digestão (Fig. 60). A membrana dos grânulos, os ribosomas, as mitocôndrias e as gotículas lipídicas, permanecem inalteradas. Dado que a oxidação, antes da digestão, desvanece os cristalóides, procurámos avaliar a acção da prónase nestas estruturas fazendo-a actuar em cortes não oxidados de peças fixadas somente em glutaraldeído. Nestas condições, não se observou qualquer efeito da prónase.

Os tratamentos de controlo foram negativos.

Coloração pela metenamina-prata — O ácido periódico/ /metenamina-prata cora intensamente a matriz e os cristalóides em cortes ultrafinos de peças fixadas em tetróxido de ósmio ou glutaraldeído apenas (Fig. 64). A omissão do tratamento pelo ácido periódico anula a coloração da matriz enquanto os cristalóides continuam corados (Fig. 63). Com qualquer dos fixadores forma-se discreto precipitado de fundo sob a forma

de finos grãos electrono-opacos de prata que é mais intenso na fixação pelo glutaraldeído. Com o método utilizado, os melhores

---

Fig. 60 — Parte de célula diferenciada de rato macho adulto. O conteúdo dos grânulos perinucleares (*) foi extraído por um soluto aquoso de prónase a 1 p. 100 actuando durante 6 horas em cortes ultrafinos previamente oxidados. As gotículas lipídicas (L) e os ribosomas (setas) permanecem inalterados. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 56. 19 800 ×

Fig. 61 — Grânulo perinuclear de matriz moderadamente densa com cristalóide levemente corado e gotícula lipídica (L) incolor. Fixação: glutaraldeído. Coloração: citrato de chumbo. 25 000 ×

Fig. 62 — Grânulo perinuclear de matriz densa com cristalóide menos denso. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Entre os fixadores, os blocos foram imersos em acetona (24 horas a 4°C). Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 28 000 ×

Fig. 63 — Células em início de diferenciação de rato macho adulto após coloração de controlo pela metenamina-prata em cortes de peças fixadas pelo glutaraldeído. O citoplasma das células, a matriz dos grânulos perinucleares (X) e as gotículas lipídicas (L) apresentam fino precipitado inespecífico enquanto os cristalóides (setas longas) aparecem intensamente corados. As setas curtas apontam bandas claras rectilíneas, incolores, no interior dos grânulos. 8 060 ×

Fig. 64 — Corte adjacente ao anterior, corado pela metenamina-prata após oxidação pelo ácido periódico. A matriz dos grânulos perinucleares (X) aparece intensamente corada, permanecendo densos os cristalóides (setas). As bandas claras rectilíneas da matriz dos grânulos continuam incolores (setas curtas). 7 280 ×

Fig. 65 — Grande massa cristalóide do sebo, densa. Fixação: tetróxido de ósmio. Corte não corado. 49 600 ×

Fig. 66 — Após fixação pelo glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio, há diminuição da densidade das grandes massas cristalóides do sebo. As setas apontam linhas de junção entre cristalóides adjacentes. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 15 300 ×

Fig. 67 — Grande massa cristalóide do sebo, densa. Fixação: glutaraldeído. Coloração: acetato de uranilo em bloco. 26 000 ×

Fig. 68 — Grande massa cristalóide do sebo apenas tenuemente densa. Fixação: glutaraldeído. Coloração: citrato de chumbo. 45 600 ×

Fig. 69 — Gotículas lipídicas (L) intensamente coradas após oxidação dos cortes num soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 durante 10 minutos. Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 28 000 ×

Fig. 70 — Gotículas lipídicas (L) incolores após oxidação dos cortes num soluto aquoso de peróxido de hidrogénio a 3 p. 100 durante 30 minutos e subsequente tratamento por um soluto aquoso de tetróxido de ósmio a 1 p. 100 durante 4 horas. Fixação: tetróxido de ósmio. 28 000 ×

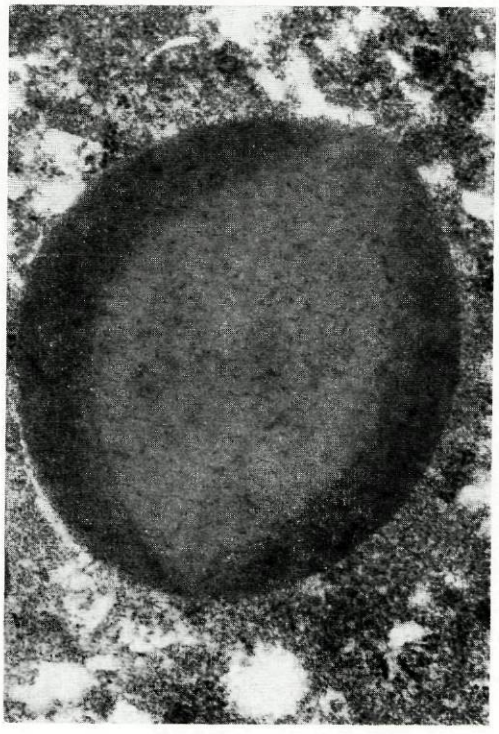
Fig. 71 — O conteúdo das gotículas lipídicas (L) é extraído pela acetona enquanto a densidade da matriz dos grânulos perinucleares (X) permanece inalterada. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Entre os fixadores os blocos foram imersos em acetona (24 horas a 4°C). Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 15 000 ×



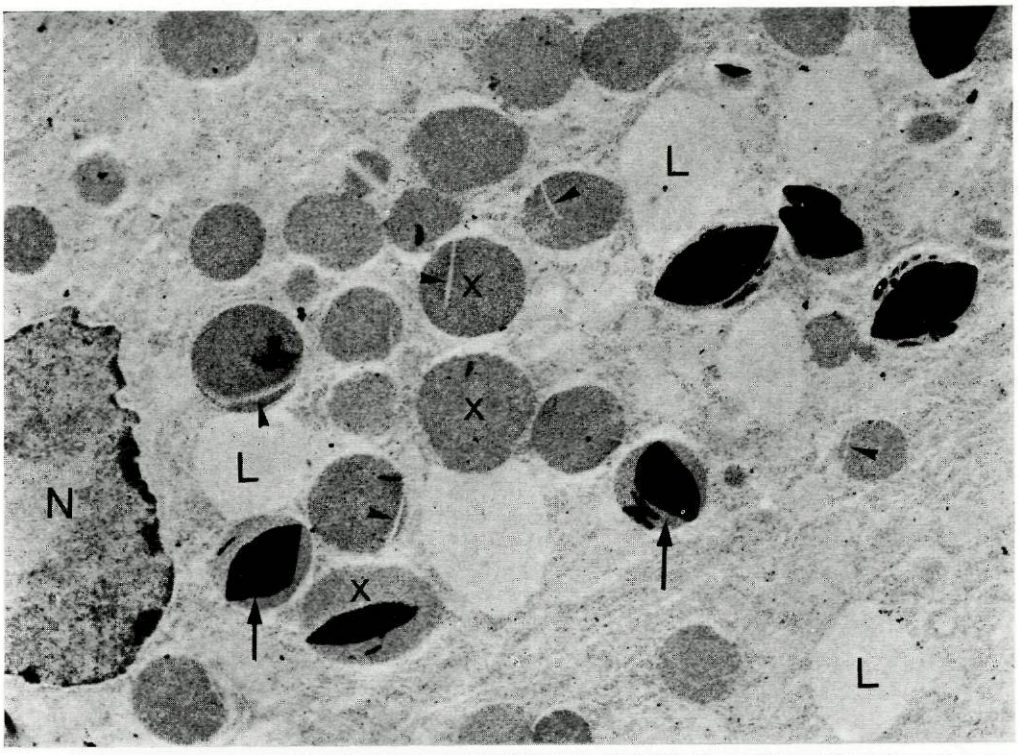
60



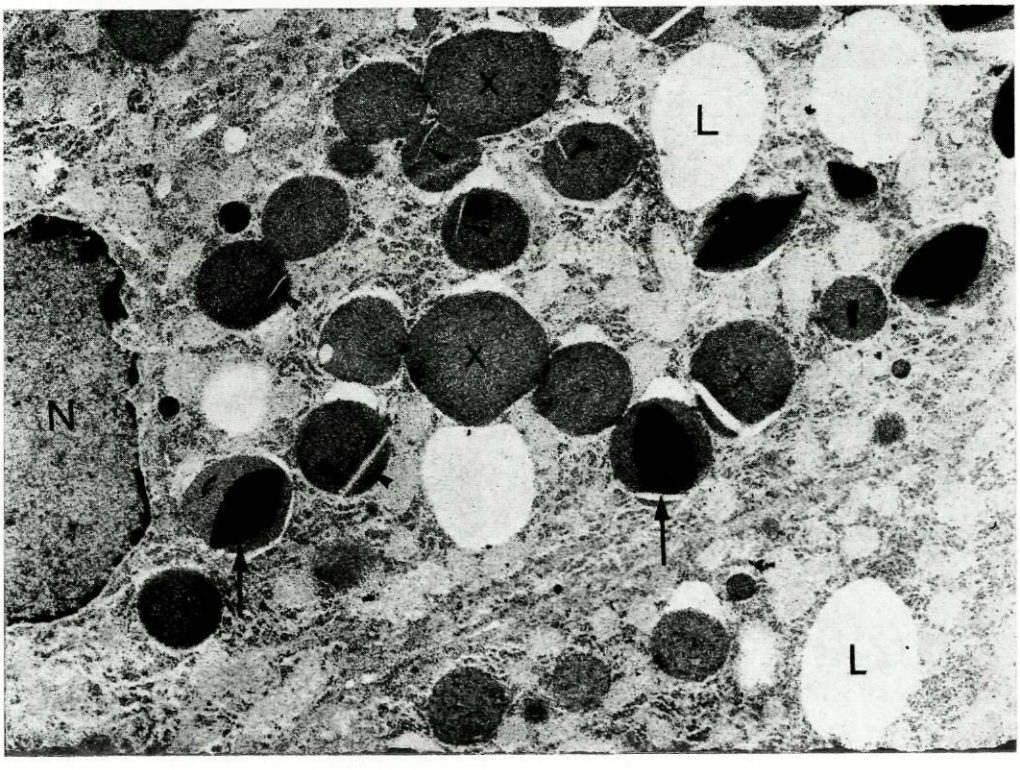
61



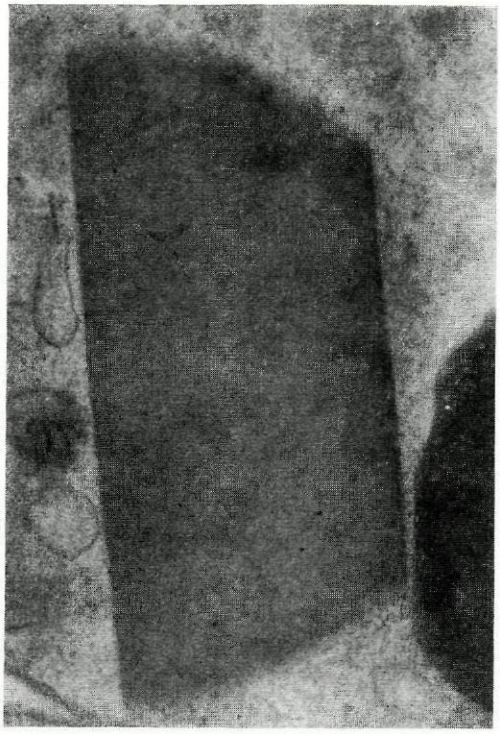
62



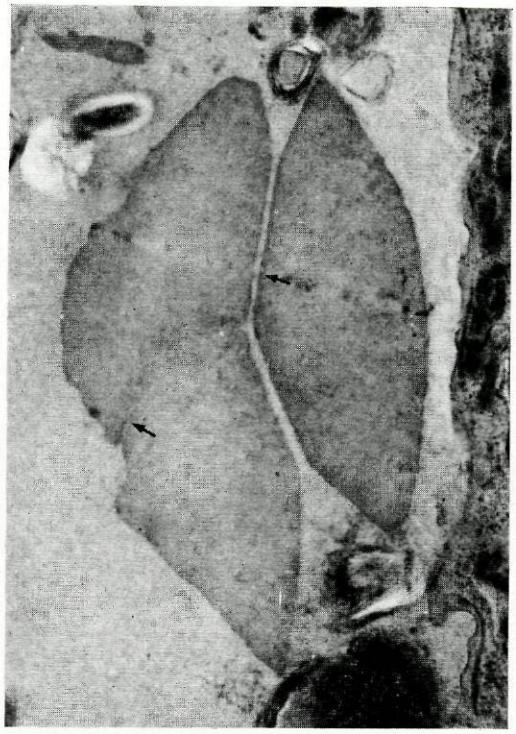
6



6



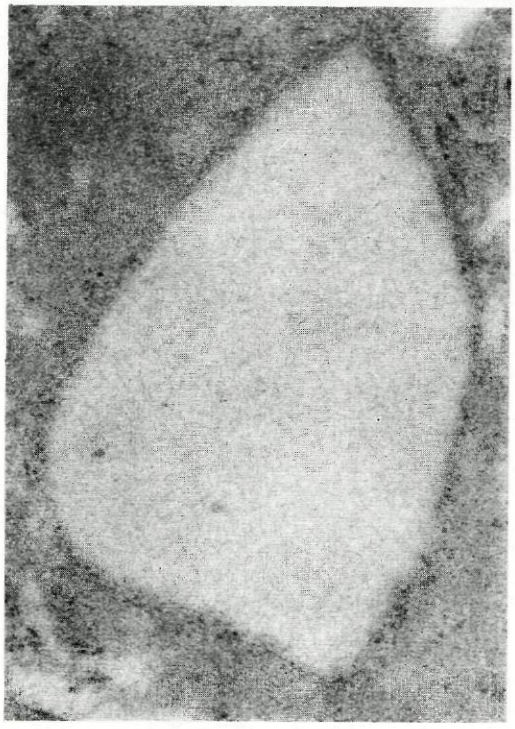
65



66



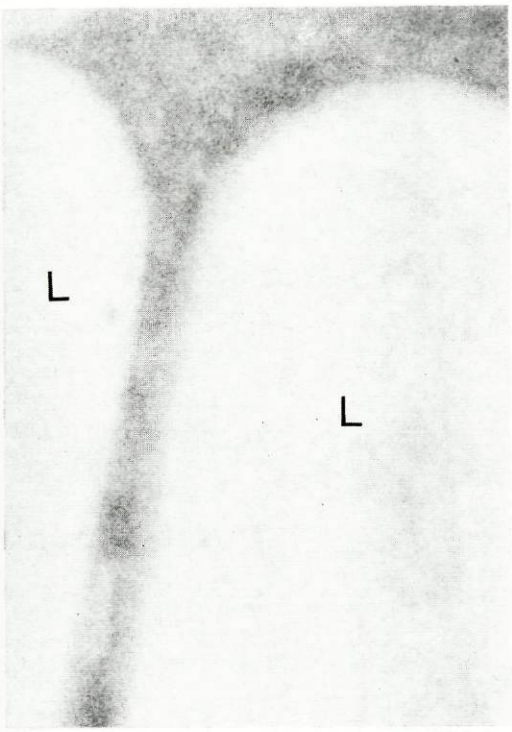
67



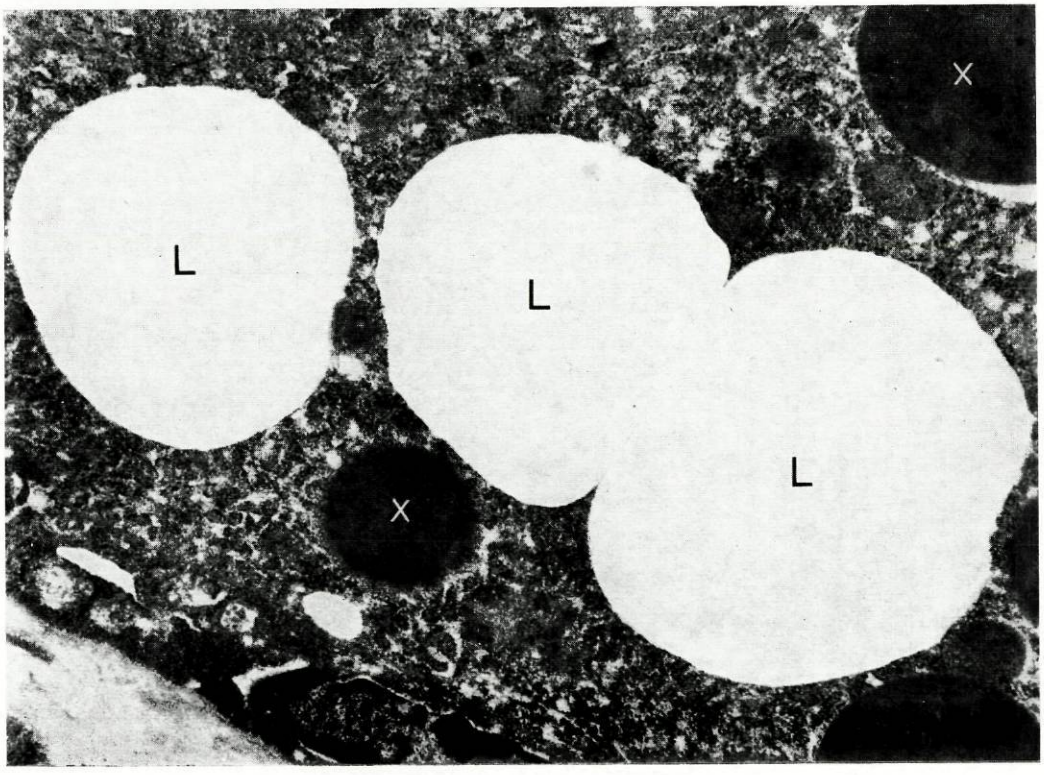
68



69



70



71

resultados, ou seja, menor precipitado inespecífico de fundo, foram obtidos em cortes de tonalidade prateada repetidamente lavados após fixação com o ácido periódico e corados durante 45 minutos. O resultado da coloração foi idêntico em cortes de glândulas de ratos com 2 semanas de idade, fixadas em tetróxido de ósmio.

Extracção pela acetona — A acetona, actuando nos blocos à temperatura ambiente ou a 4°C, entre a fixação pelo glutaraldeído e pelo tetróxido de ósmio, diminui levemente o contraste dos cristalóides (Fig. 62) e das grandes massas cristalóides do sebo. O conteúdo das gotículas lipídicas é totalmente extraído (Fig. 71).

B — Actividades enzimáticas

Fosfátase ácida

Microscopia de luz

Com o **método do nitrato de chumbo de Gomori** observámos, já aos 5 minutos de incubação, actividade fosfatásica ácida nas células secretoras (Fig. 74) e no sebo (Fig. 75). Nas células, o precipitado de sulfureto de chumbo deposita-se em anel à periferia dos grânulos perinucleares ou em pequenas pontuações na matriz (Fig. 74). Os cristalóides não apresentam reacção. A actividade fosfatásica é marcada nos grânulos das células diferenciadas, mais intensa ainda nos das células completamente diferenciadas e quase nula nos grânulos das células em início de diferenciação. No sebo, observa-se reacção positiva no fundo entre as grandes massas cristalóides e as gotículas lipídicas incolores (Fig. 75). Em glândulas de ratos com 2 semanas, o

resultado é idêntico se bem que a intensidade da reacção seja menos marcada.

Com o **método dos sais de diazónio de Barka e Anderson (1962)**, aos 15-30 minutos de incubação, a matriz dos grânulos perinucleares (Fig. 76) e o material amorfo do sebo (Fig. 77) coram discretamente de vermelho em contraste com os cristalóides intragranulares (Fig. 76) e as grandes massas cristalóides do sebo (Fig. 77) que não coram.

A coloração foi negativa nos controlos.

Fig. 72 — Células completamente diferenciadas com grânulos perinucleares de cor vermelha-alaranjada e gotículas lipídicas coradas de preto. Na matriz dos grânulos não se distinguem cristalóides. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método de OTAN de Adams (1959). 990 ×

Fig. 73 — A extracção pela acetona inibe a coloração das gotículas lipídicas enquanto permanece a coloração vermelha-alaranjada dos grânulos perinucleares. Fixação e coloração como na figura anterior. 990 ×

Fig. 74 — Actividade de fosfátase ácida nos grânulos perinucleares de células diferenciadas. O precipitado negro de sulfureto de chumbo deposita-se em anel na periferia dos grânulos ou em pequenas pontuações na matriz. Os cristalóides intragranulares são incolores. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método de Gomori (variante de Barka e Anderson) para pesquisa da fosfátase ácida. Incubação de 5 minutos. 990 ×

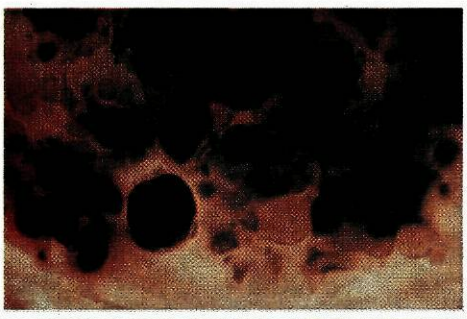
Fig. 75 — Grandes massas cristalóides do sebo, incolores, rodeadas por material amorfo, fosfátase ácida positivo. Fixação e coloração como na figura anterior. 990 ×

Fig. 76 — Grânulos perinucleares com matriz corada de vermelho pálido. Os cristalóides intragranulares são incolores. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método dos sais de diazónio para pesquiza da fosfátase ácida. Incubação de 20 minutos. 990 ×

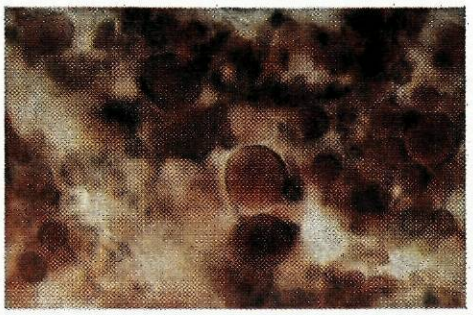
Fig. 77 — Grandes massas cristalóides do sebo, não coradas, revestidas por material amorfo de cor vermelha. Fixação e coloração como na figura anterior. 990 ×

Fig. 78 — Células em desagregação com grânulos perinucleares de matriz corada de vermelho e cristalóides incolores. Fixação: formol-cálcio. Corte de congelação. Coloração: método de Hayashi (1964) para pesquisa da β-glucuronídase. Incubação de 5 minutos. 990 ×

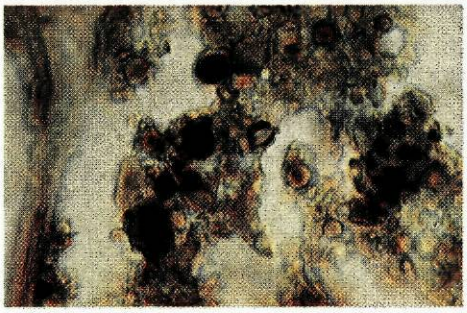
Fig. 79 — Grandes massas cristalóides do sebo, incolores, envoltas por material amorfo de cor vermelha. Fixação e coloração como na figura anterior. 990 ×



72



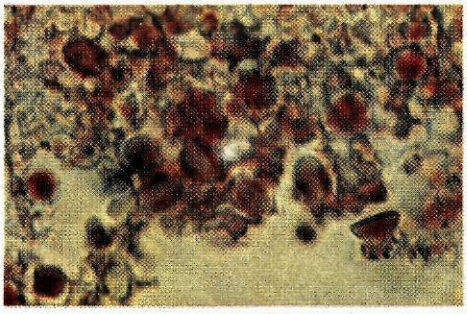
73



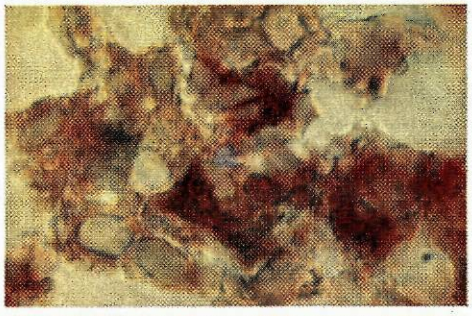
74



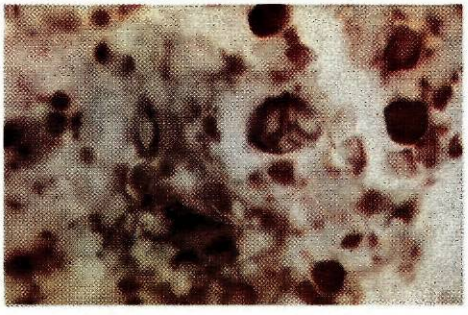
75



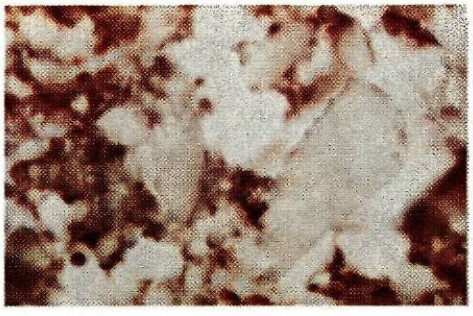
76



77



78



79

Microscopia electrónica

Observámos deposição de fosfato de chumbo, aos 15 minutos de incubação, na periferia da matriz dos grânulos perinucleares (Figs. 81-83), na matriz dos pequenos corpos densos (Fig. 84) e nos corpos autofágicos do tipo 4 das células em desagregação (Fig. 85). Havia também reacção positiva na zona de vesículas que se situa numa das faces dos aparelhos de Golgi (Figs. 81 e 83). O método de Etherton e Botham (1970) forneceu melhor captação enzimática da actividade do que o de Miller e Palade (1964). A fixação na mistura de glutaraldeído--peróxido de hidrogénio (Peracchia e Mittler, 1972) foi também a que permitiu melhores resultados.

Fig. 80 — Corte não tratado de célula diferenciada mostrando aparelho de Golgi (Go) com numerosas vesículas e túbulos no lado direito das cisternas (seta) e três grandes vesículas secretoras (*) idênticas a grânulos perinucleares de pequenas dimensões. No topo da figura observa-se grânulo perinuclear com matriz e cristalóide densos (C). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 18 600 ×

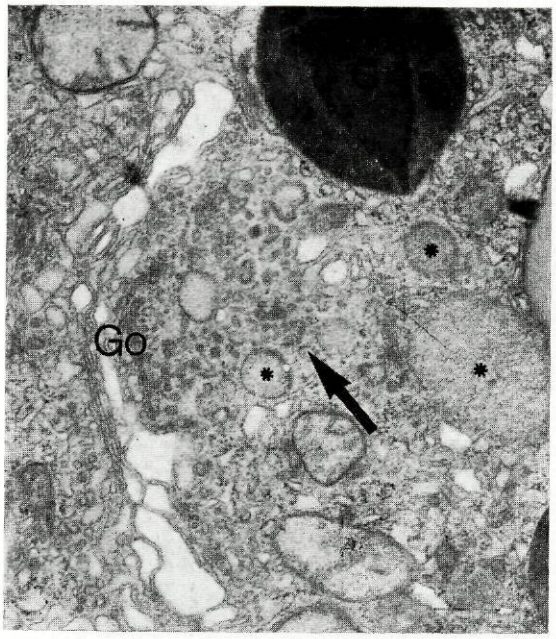
Fig. 81 — Aparelho de Golgi (Go) de célula diferenciada com precipitado de chumbo (seta) na área vesicular adjacente às pilhas de cisternas. O grânulo (*) contém actividade de fosfátase ácida. Fixação: glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio. Pesquisa da fosfátase ácida pelo método de Etherton e Botham (1970). Incubação de 15 minutos. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 27 000 ×

Fig. 82 — Grânulo perinuclear de célula diferenciada com actividade de fosfátase ácida na extremidade superior da matriz (M). Cristalóide (Cr) intragranular não corado. Fixação, tratamento dos cortes e coloração como na figura anterior. 34 000 ×

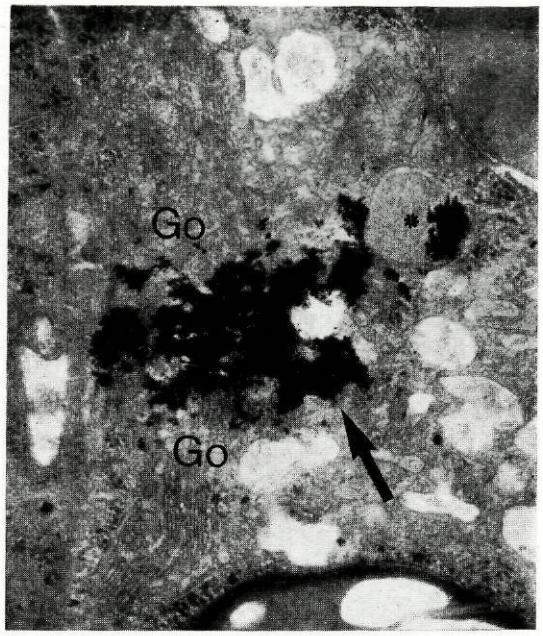
Fig. 83 — Grânulos perinucleares de célula diferenciada com depósitos de fosfato de chumbo na periferia da matriz (M) e em manchas interpostas (setas curtas) entre cristalóides (Cr) incolores. A tonalidade clara da matriz e dos cristalóides, nesta figura e na anterior, deve-se à oxidação destas estruturas pelo peróxido de hidrogénio durante a fixação. Junto das cisternas do aparelho de Golgi (Go) observam-se vesículas secretoras coradas pelo fosfato de chumbo (setas divergentes) e vesícula de maior dimensão (*) que parece corresponder a um grânulo perinuclear incipiente. Fixação, tratamento dos cortes e coloração como na figura 81. 28 000 ×

Fig. 84 — Célula diferenciada com numerosos pequenos corpos densos (setas finas e longas). Alguns deles mostram actividade de fosfátase ácida positiva (setas grossas). Fixação, tratamento dos cortes e coloração como na figura 81. 139 500 ×

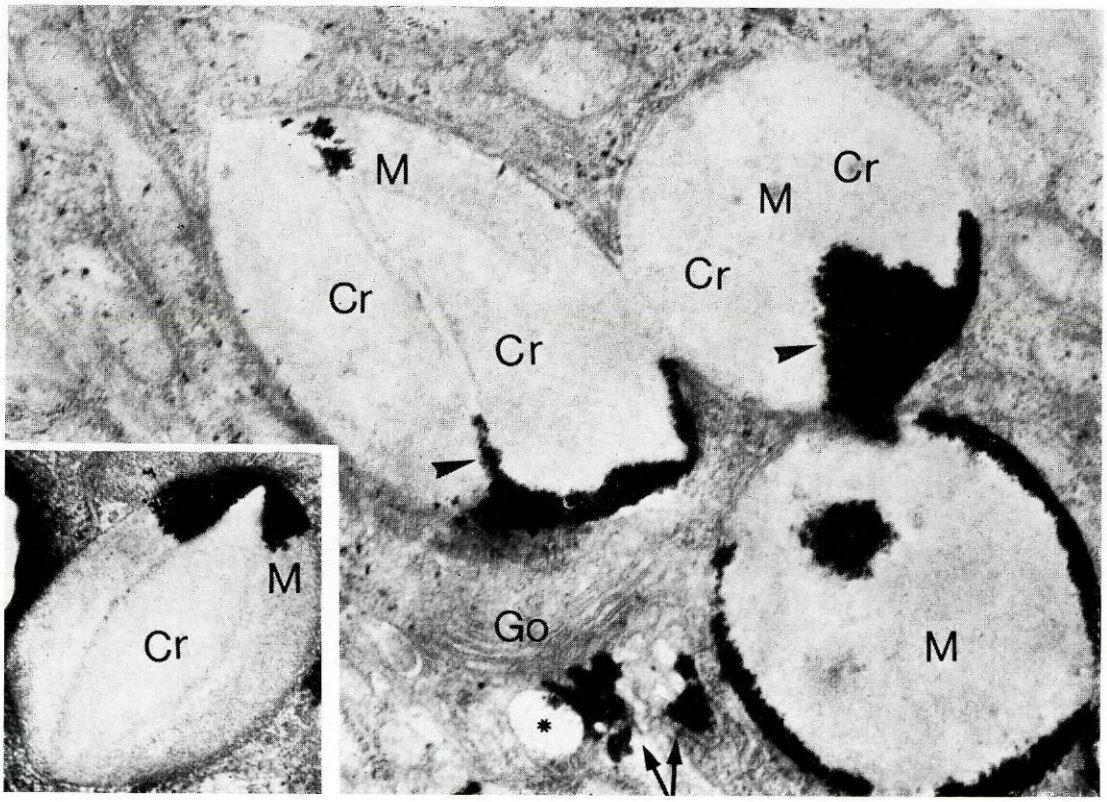
Fig. 85 — Corpo autofágico do tipo CA4 evidenciando actividade de fosfátase ácida positiva (seta). Fixação, tratamento dos cortes e coloração como na figura 81. 100 000 ×



80

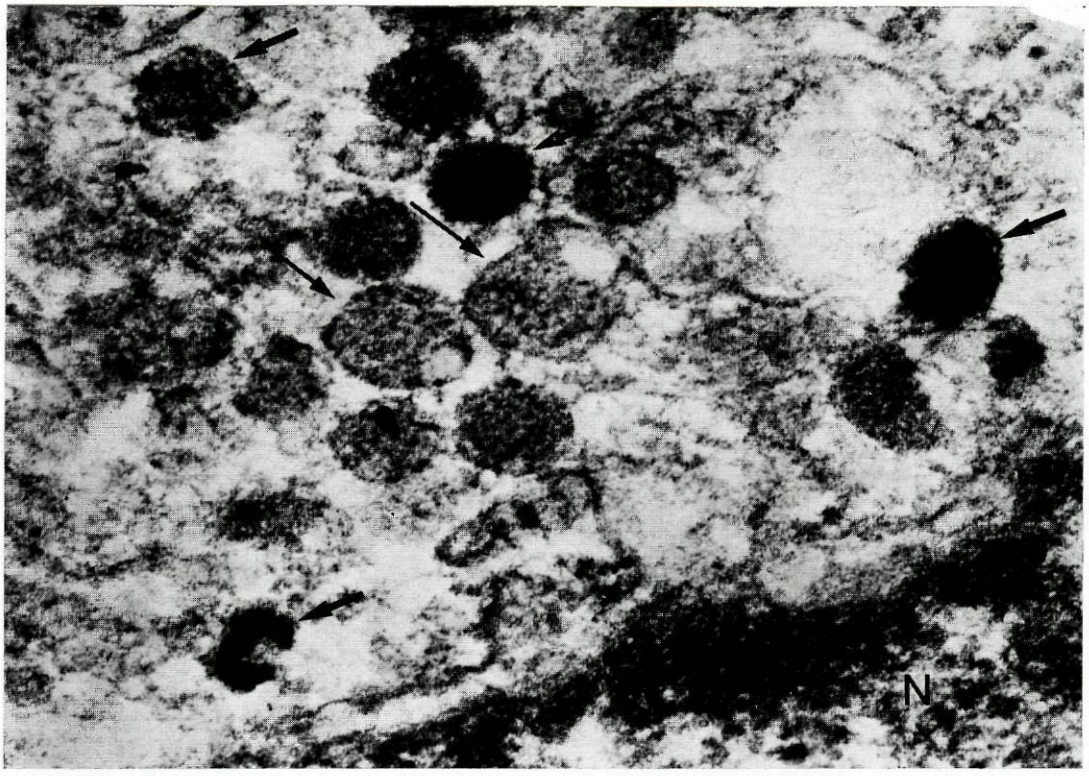


81

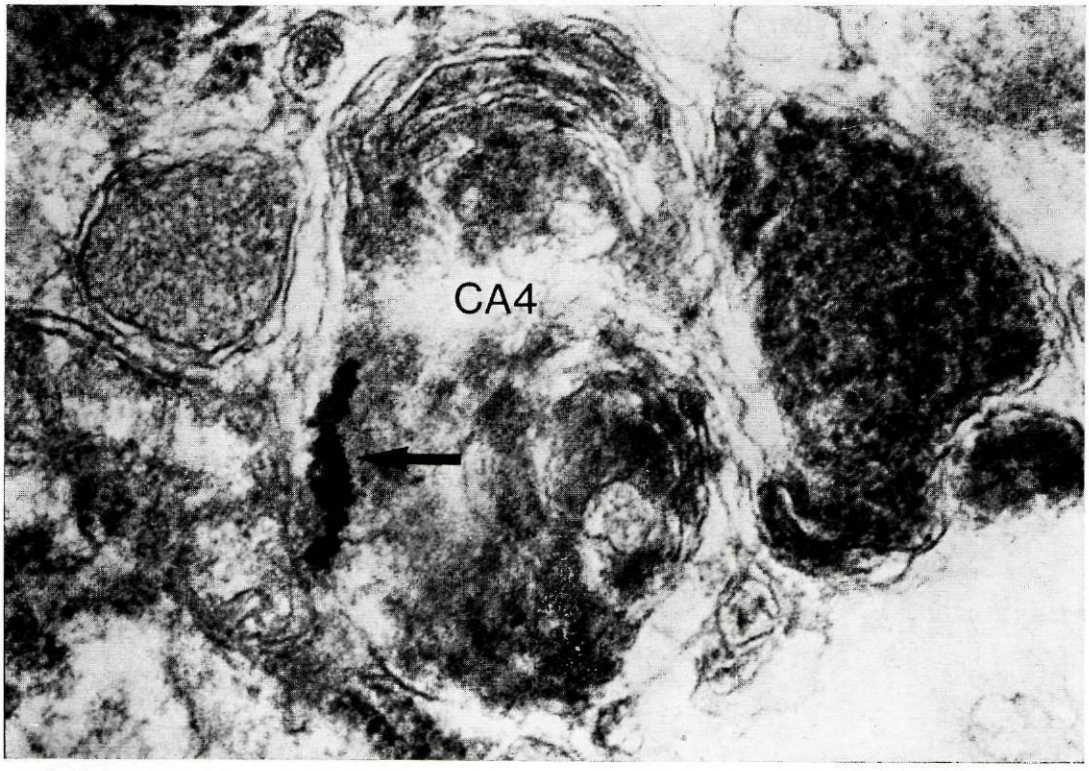


82

83



84



85

Nos cortes de controlo, a supressão do β-glicerofosfato de sódio e do α-naftil-fosfato dos meios de incubação impediu a reacção.

β-glucuronídase

Em cortes de congelação tratados pelo método de Hayashi (1964), a matriz dos grânulos perinucleares (Fig. 78) e o material amorfo do sebo (Fig. 79) coram de vermelho enquanto os cristalóides e as grandes massas cristalóides não coram (Figs. 78 e 79). As melhores colorações obtêm-se aos 10-15 minutos de incubação. O resultado foi idêntico em glândulas de ratos adultos e em glândulas de ratos com 2 semanas de vida.

A fervura dos cortes impede a reacção.

N-acetil-β-glucosaminídase

Não se verificou coloração.

Aril-sulfátases A e B

Ausência de coloração.

EFEITOS DA TESTOSTERONA, ESTRADIOL E ORQUIDECTOMIA NA CITOLOGIA E CITOQUÍMICA DAS CÉLULAS SECRETORAS

Testosterona

Microscopia de luz

A administração de propionato de testosterona a ratos fêmeas não provocou modificações morfológicas aparentes na glândula. Todavia, o estudo quantitativo dos diâmetros dos grânulos perinucleares e das gotículas lipídicas e o das concentrações dos primeiros nas células completamente diferenciadas, patenteou algumas variações apreciáveis. Dado que o teste *t* não revelou diferenças significativas (Quadro 1) entre os valores médios individuais dos dois animais injectados, no referente

a cada um dos três parâmetros considerados, trataram-se conjuntamente os valores numéricos dos dois ratos. Procedeu-se da mesma forma com os controlos.

Assim, em cortes corados pela hemateína ácida de Baker, a concentração média dos grânulos perinucleares por unidade de superfície nas fêmeas injectadas [15,66 ± 0,23 (D.P.M.) grânulos/100 μm^2] (Quadro 1) mostrou-se significativamente maior ($P<0,01$) (Quadro 2) do que a obtida nas fêmeas não tratadas (14,86 ± 0,14 grânulos/100 μm^2) (Quadro 1). O diâmetro médio dos grânulos (2,84 ± 0,04 μm) (Quadro 1) não diferiu, porém, de forma estatisticamente significativa ($P>0,7$) (Quadro 2). do diâmetro médio nas fêmeas não injectadas (Quadro 1). Finalmente, nos ratos fêmeas injectados, o diâmetro médio das gotículas lipídicas em preparações coradas pelo Negro de Sudão B (2,98 ± 0,03 μm) (Quadro 1) revelou-se aumentado de forma significativa ($P<0,001$) (Quadro 2) relativamente ao diâmetro das gotículas lipídicas nos ratos fêmeas não injectados (2,72 ± 0,03 μm) (Quadro 1). Não se registou variação estatística entre as fêmeas tratadas com testosterona e os machos normais, para nenhum dos parâmetros (Quadro 2). Pelo contrário, a injecção desta hormona determinou valores significativamente mais elevados da concentração média dos grânulos perinucleares ($P<0,01$) e do diâmetro médio das gotículas lipídicas ($P<0,001$) em relação com os dos ratos machos injectados com estradiol (Quadro 2). O mesmo se verificou quanto ao diâmetro médio das gotículas lipídicas ($P<0,001$) em comparação com o dos ratos orquidectomizados (Quadro 2).

Microscopia electrónica

Nas células diferenciadas dos ratos tratados, as cisternas do retículo endoplásmico rugoso são habitualmente mais dilatadas (Figs. 86 e 87) do que nas células dos ratos fêmeas normais (Fig. 17). As áreas circunscritas do retículo endoplásmico liso são também mais numerosas e volumosas. Algumas células apresentam áreas extraordinariamente volumosas de retículo

endoplásmico liso envolvendo gotículas lipídicas (Figs. 88 e 89), em cujas imediações se verifica decréscimo do número dos ribosomas livres e cisternas, isoladas e alongadas, do retículo endoplásmico rugoso com poucos ribosomas aderentes (Fig. 88). O conteúdo das gotículas lipídicas, sobretudo das de maiores dimensões, mostra-se frequentemente mais extraído do que no caso dos animais normais (Figs. 86 e 87). Quer nas células em início de diferenciação quer nas diferenciadas observam-se já pequenos corpos autofágicos com ribosomas e restos de membranas no interior (Figs. 86 e 87). Nas células em desagregação não se observaram diferenças em relação aos animais controlos.

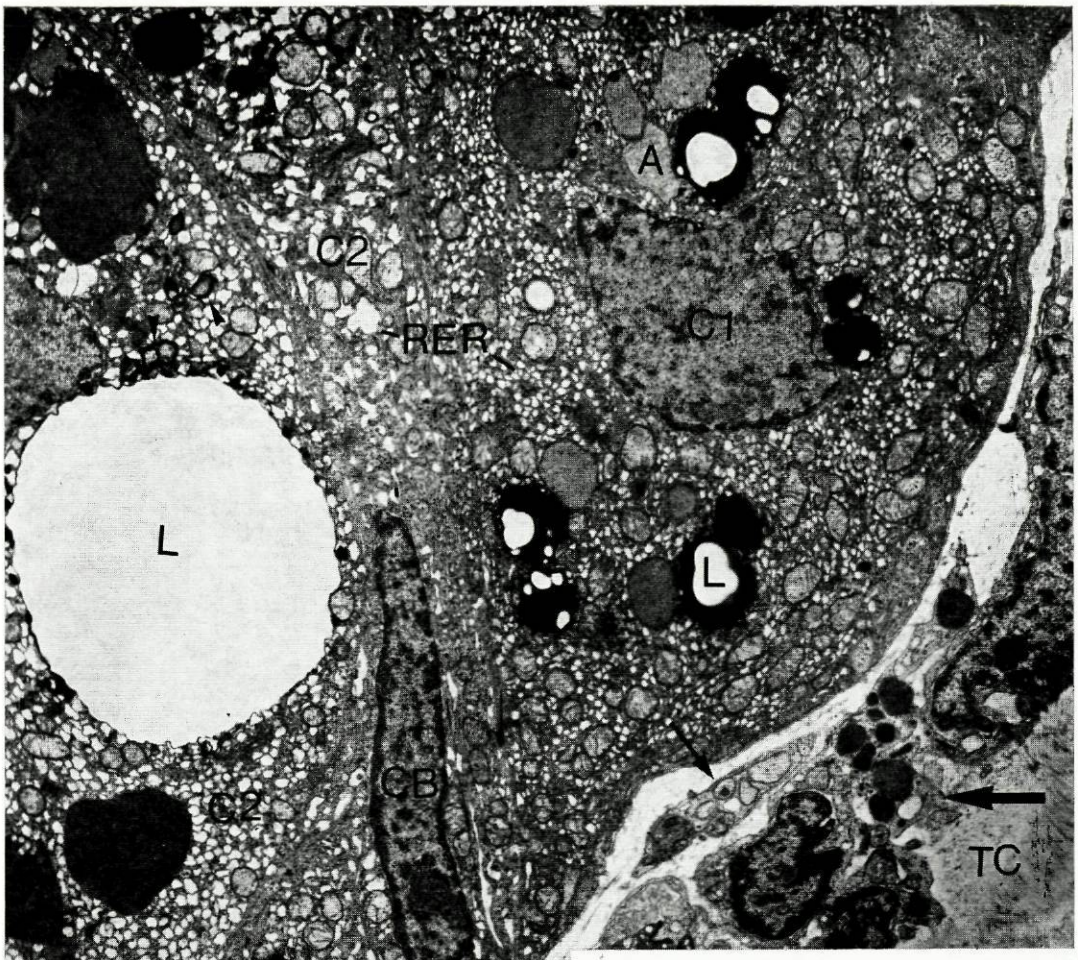
A morfologia fina dos núcleos das células dos ratos fêmeas tratados com testosterona não diferia da dos ratos fêmeas normais (Fig. 86).

Fig. 86 — Ácino de glândula prepucial de rato fêmea após administração da testosterona. Observam-se células em início de diferenciação (C1) e diferenciadas (C2) com marcada dilatação das cisternas do retículo endoplásmico rugoso (RER), grânulos perinucleares (A e C) e gotículas lipídicas (L) de diverso tamanho e densidade. Nas células diferenciadas apontam-se pequenos corpos autofágicos (setas curtas). No tecido conjuntivo (TC) assinalam-se feixes de fibras nervosas amielínicas (seta fina) e um mastócito (seta longa). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 6 600 ×

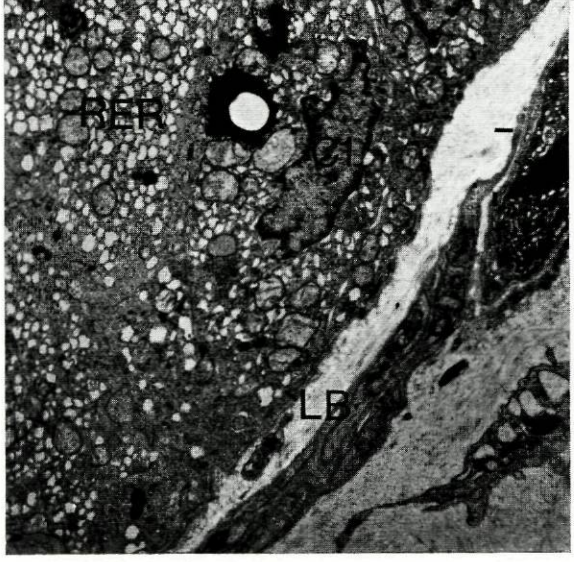
Fig. 87 — Ampliação de parte de célula diferenciada de glândula prepucial de rato fêmea após tratamento com testosterona. Notar gotícula lipídica clara (L), grânulos perinucleares de matriz densa (C) (o da direita apresenta invaginação da membrana e banda clara rectilínea), cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso, mitocôndrias (mi), corpos autofágicos (setas) e um aparelho de Golgi (Go). Fixação e coloração como na figura 86. 13 500 ×

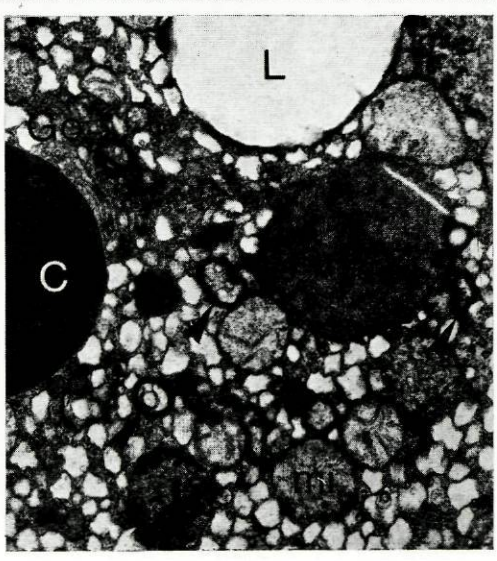
Fig. 88 — Hipertrofia do retículo endoplásmico liso (REL) provocada pela injecção de testosterona em rato fêmea. Na imagem destaca-se gotícula lipídica (L) envolta por volumosa área de túbulos de parede lisa (REL). No caso desta célula observa-se, concomitantemente, diminuição do número das cisternas do retículo endoplásmico rugoso (setas) e escassez de ribosomas livres. Célula basal (CB). Fixação e coloração como na figura 86. 22 200 ×

Fig. 89 — Pormenor da estrutura do retículo endoplásmico liso (REL) e da gotícula lipídica (L) da figura anterior. Nalguns locais (setas) é evidente a continuidade entre os túbulos de parede lisa e o material gordo. Fixação e coloração como na figura 86. 29 600 ×

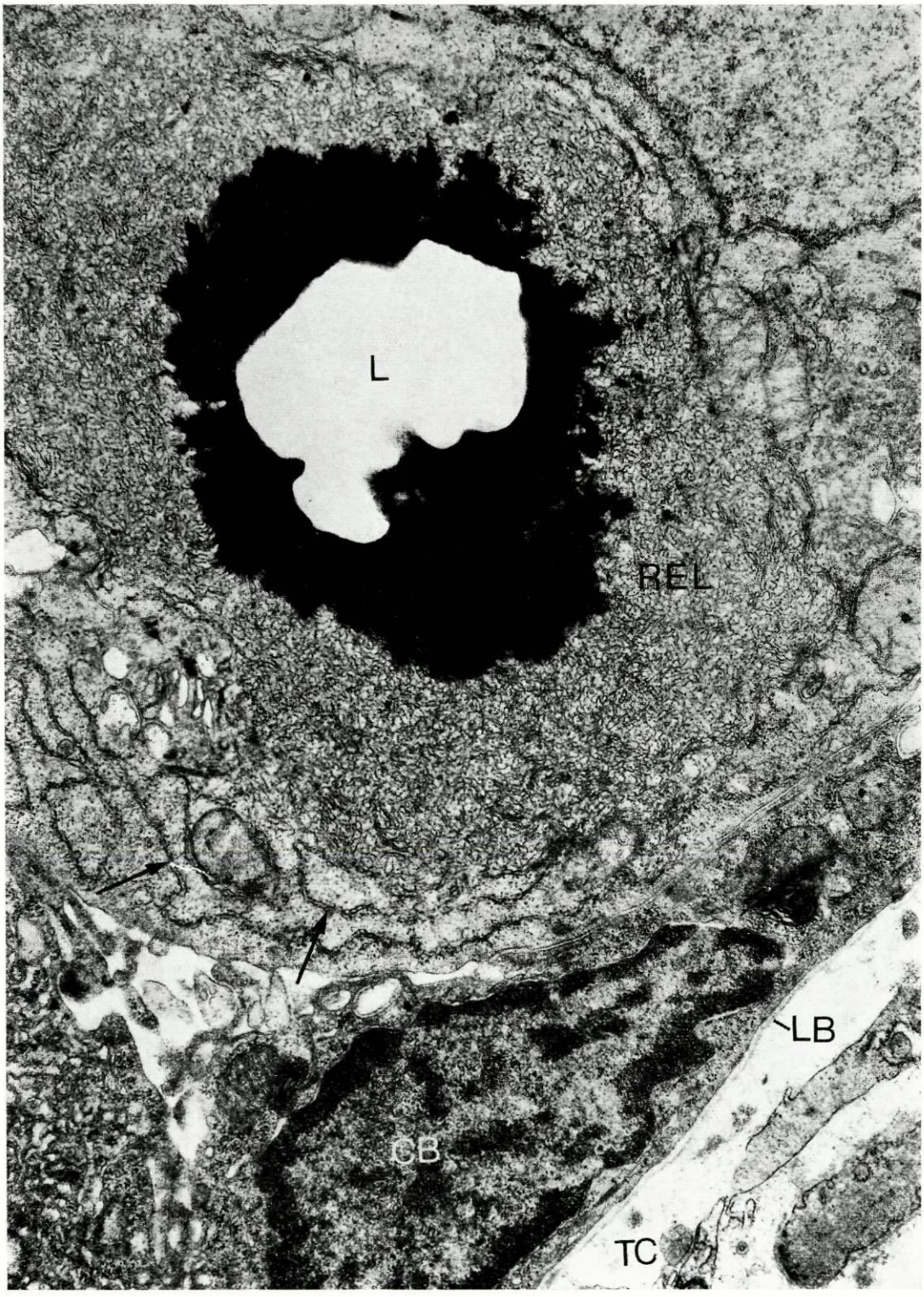


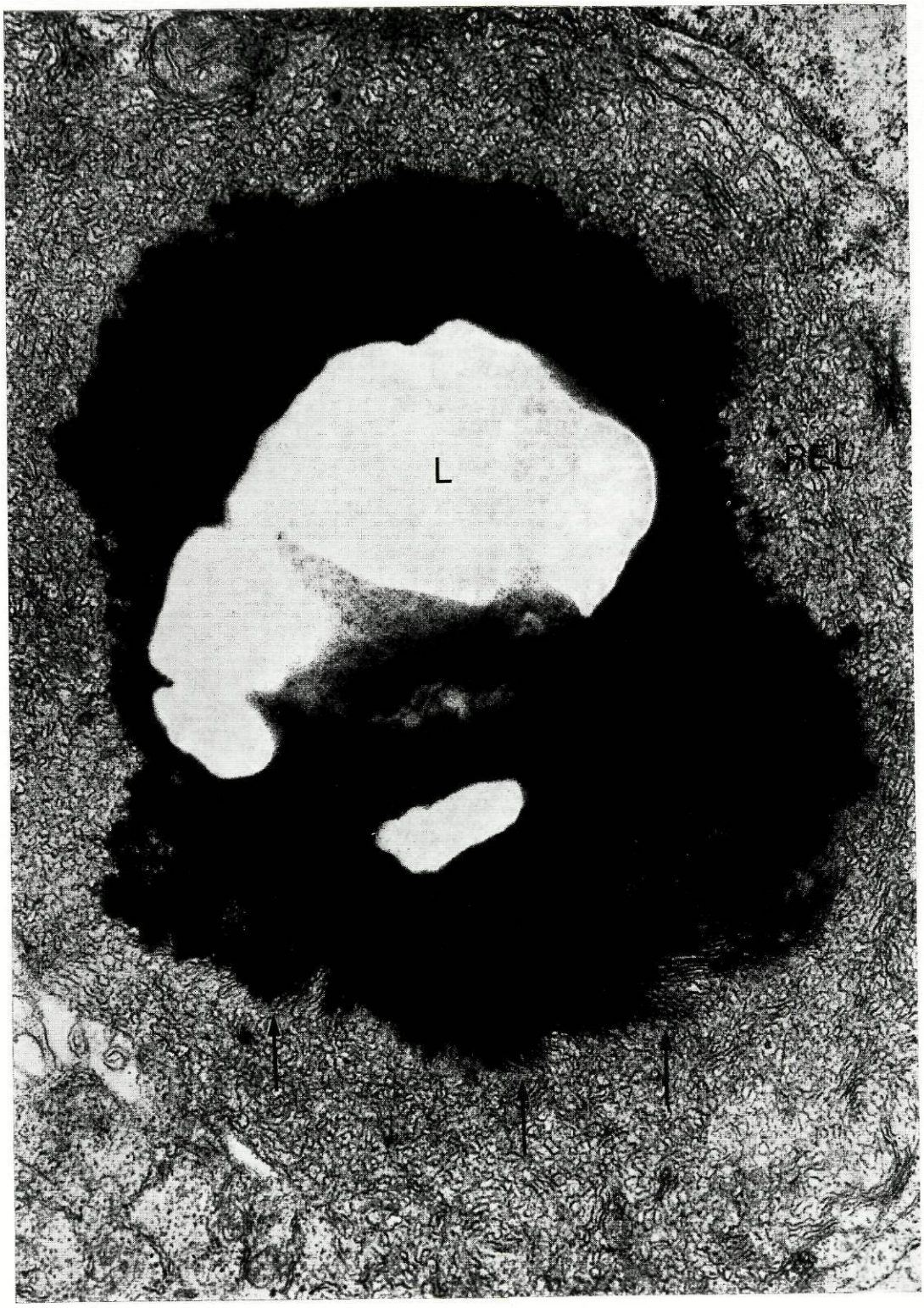
86





87


L
REL
LB
CB
TC


L

Estradiol

Microscopia de luz

Da mesma forma que no caso da administração da testosterona a ratos fêmeas, a injecção de benzoato de estradiol a ratos machos, apenas provocou modificações quantitativas apreciáveis dos grânulos e das gotículas lipídicas em relação aos controlos normais, sem que se registassem variações qualitativas aparentes.

Entre os valores médios dos dois animais injectados e entre os valores médios dos dois controlos, o teste *t* não mostrou diferenças significativas (Quadro 1). Os valores (Quadro 1) do diâmetro ($2{,}84 \pm 0{,}05$ μm) e da concentração dos grânulos perinucleares ($14{,}87 \pm 0{,}21$ grânulos/100 μm^2) dos ratos machos injectados não divergiram significativamente (Quadros 1 e 2) dos valores médios respectivos registados nos ratos machos normais. Todavia, o diâmetro médio das gotículas lipídicas ($2{,}43 \pm 0{,}03$ μm) mostrou-se diminuído de modo acentuado ($P < 0{,}001$) em relação ao dos machos controlos ($2{,}98 \pm 0{,}04$ μm) (Quadros 1 e 2). Observou-se a mesma variação estatística em relação aos ratos fêmeas controlos (Quadro 2).

Microscopia electrónica

Nas células em início de diferenciação e nas diferenciadas (Fig. 90) observámos, em comparação com as dos ratos machos normais, menor número de ribosomas e de polirribosomas livres e menor dilatação das cisternas do retículo endoplásmico rugoso. Nas células diferenciadas, o retículo endoplásmico liso é menos aparente. Os aglomerados de túbulos são raros, a sua área diminuta (Fig. 90) e a maioria dos pouco numerosos elementos de parede lisa encontram-se dispersos através do citoplasma. Predominam os grânulos perinucleares de matriz clara (Fig. 90). Não se distinguem corpos autofágicos e figuras de mielina nas células em início de diferenciação e nas diferenciadas. Nas células em desagregação, a estrutura fina é semelhante à exibida pelos controlos.

Orquidectomia

Macroscopicamente, as glândulas prepuciais dos ratos orquidectomizados são menos volumosas do que as dos ratos normais e as dos machos injectados com estradiol. Ao microscópio de luz, os ácinos secretores apresentam-se diminuídos de volume e de número e os canais excretores são mais curtos e menos ramificados do que nos controlos normais.

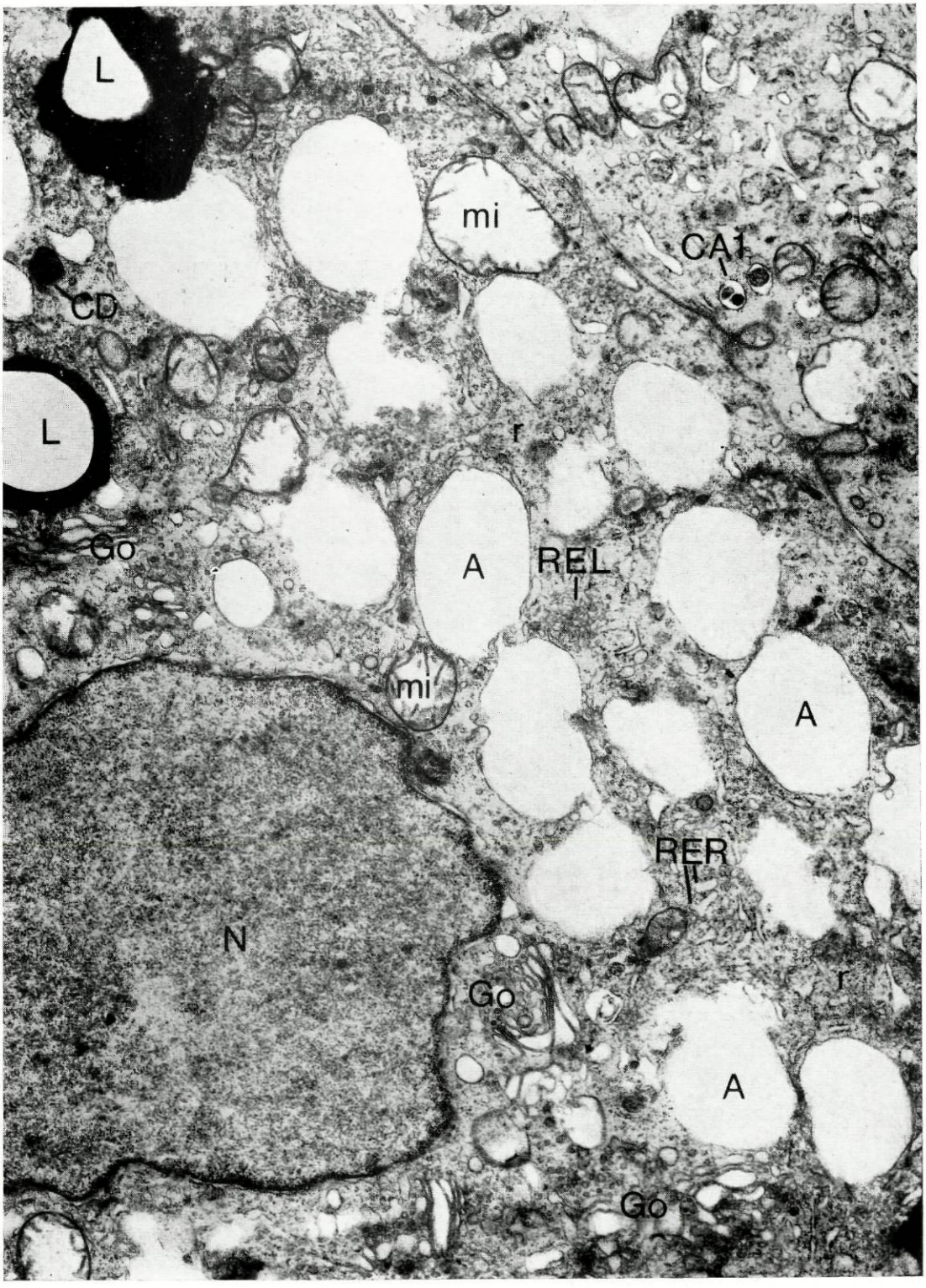
A análise pelo teste *t* das diferenças entre os valores médios nos dois animais castrados (Quadro 1) não mostrou diferenças significativas pelo que, tratados em conjunto os dados obtidos, resultaram as seguintes médias finais: diâmetro dos grânulos perinucleares — 2,66 ± 0,05 μm (D.P.M.); concentração dos grânulos perinucleares — 15,34 ± 0,22 (D.P.M.) grânulos/100 μm^2; diâmetro das gotículas lipídicas — 2,63 ± 0,04 μm (D.P.M).

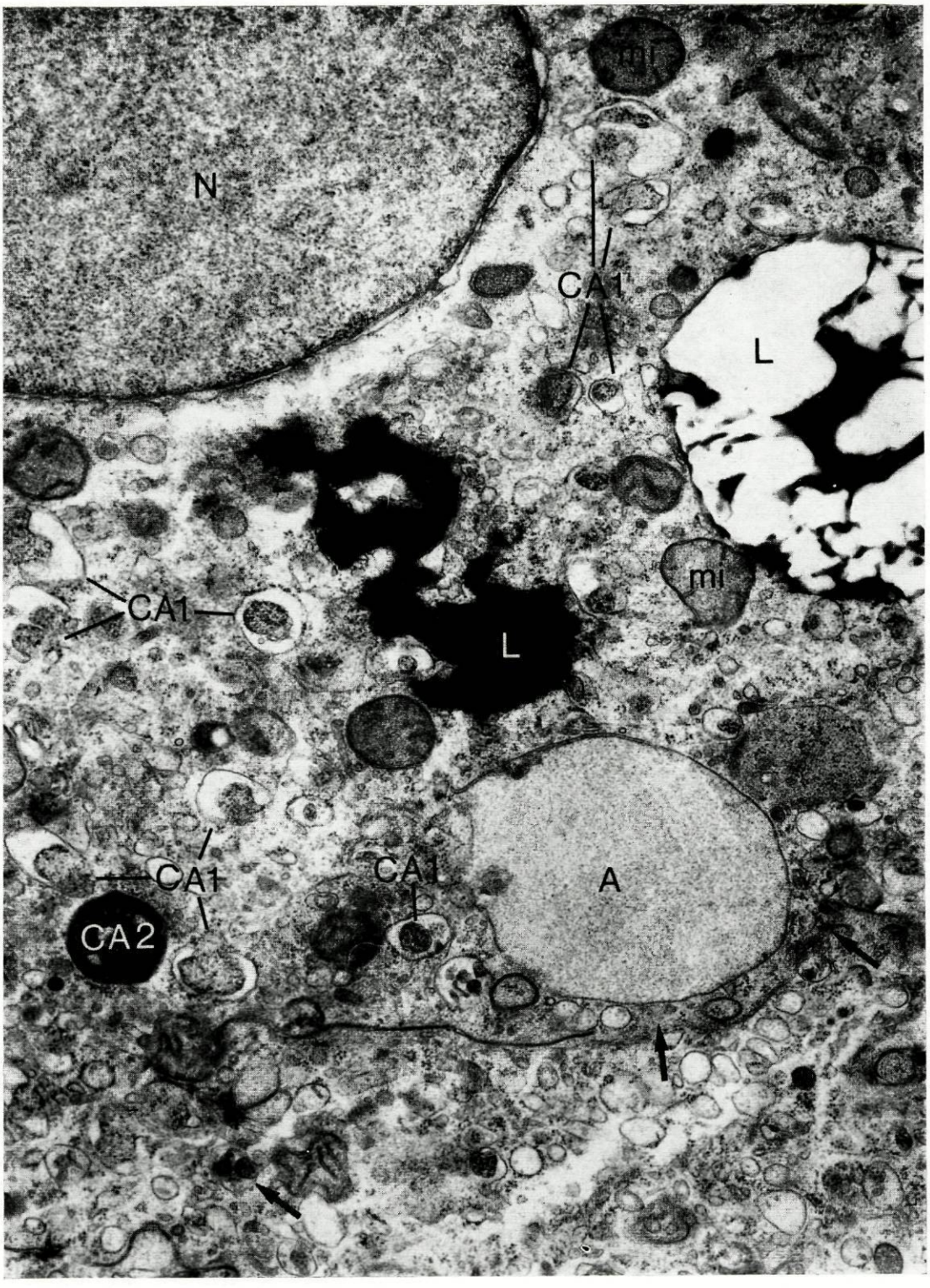
A comparação com os valores nos machos controlos do diâmetro dos grânulos perinucleares e da sua concentração média não revelou a existência de diferenças significativas (Quadros 1 e 2). Contudo, houve marcada diminuição, estatisticamente significativa ($P < 0,001$) (Quadro 2), nas dimensões das gotículas lipídicas (2,63 ± 0,04 μm) em relação às dos machos normais. Este valor médio foi também significativamente menor

---

Fig. 90 — Célula diferenciada de rato macho após administração de estradiol. No citoplasma observa-se predomínio de grânulos perinucleares de matriz clara (A), cisternas dispersas e pouco dilatadas do retículo endoplásmico rugoso (RER), discreto aglomerado de túbulos de parede lisa (REL) e pequeno número de ribosomas e de polirribosomas livres. No canto superior direito da figura vê-se célula em início de desagregação com corpos autofágicos do tipo 1 (CA1). Fixação e coloração como na figura 86. 14 000 ×

Fig. 91 — Células em desagregação de rato macho orquidectomizado. No citoplasma sobressaem pequeno número de ribosomas e de polirribosomas livres, gotículas lipídicas (L), um grânulo perinuclear de matriz clara (A) e numerosos corpos autofágicos do tipo 1 (CA1) constituídos por cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso parcialmente invaginadas. O núcleo (N) apresenta cromatina pouco densa e uniformemente distribuída. As mitocôndrias (mi) apresentam aspecto normal. Notar, ainda, interrupções da membrana protoplasmática (setas) e um corpo autofágico do tipo 2 (CA2). Fixação e coloração como na figura 86. 21 600 ×


L
mi
CAT
CD
L
r
Go
A
REL
mi
A
RER
N
Go
r
A
Go


N
mi
CA1
L
CA1
mi
L
CA1
CA1
CA2
A

QUADRO 1

Valores médios (em μm ± D.P.M.) dos diâmetros dos grânulos perinucleares e das gotículas lipídicas e da concentração dos grânulos perinucleares (número de grânulos por 100 μm² de área ± D.P.M.) medidos nas células completamente diferenciadas da porção proximal dos túbulos glandulares de glândulas prepuciais de animais tratados e controlos.

		Diâmetro dos grânulos perinucleares			Concentração dos grânulos perinucleares			Diâmetro das gotículas lipídicas		
		Diâmetro individual	P	Diâmetro final	Concentração individual	P	Concentração final	Diâmetro individual	P	Diâmetro final
Ratos machos	Controlo 1	2,84	> 0,05	2,72 ± 0,07	15,30	> 0,7	15,35 ± 0,16	2,97	> 0,7	2,98 ± 0,05
	Controlo 2	2,60			15,40			3,00		
	Orquidectomizado 1	2,69	> 0,5	2,66 ± 0,05	15,40	> 0,7	15,34 ± 0,22	2,64	> 0,7	2,63 ± 0,04
	Orquidectomizado 2	2,63			15,28			2,61		
	Inj. com estradiol 1	2,90	> 0,2	2,84 ± 0,05	14,84	> 0,7	14,87 ± 0,21	2,46	> 0,4	2,43 ± 0,04
	Inj. com estradiol 2	2,79			14,89			2,40		
Ratos fêmeas	Controlo 1	2,97	> 0,05	2,86 ± 0,06	14,85	> 0,7	14,86 ± 0,14	2,71	> 0,4	2,72 ± 0,04
	Controlo 2	2,75			14,87			2,73		
	Inj. com testosterona 1	2,85	> 0,7	2,84 ± 0,04	15,67	> 0,7	15,66 ± 0,23	3,00	> 0,7	2,98 ± 0,04
	Inj. com testosterona 2	2,83			15,65			2,95		

QUADRO 2

Provas de significância das diferenças entre os diâmetros médios dos grânulos perinucleares e das gotículas lipídicas e a concentração média dos grânulos perinucleares nas células completamente diferenciadas da porção proximal dos túbulos glandulares de glândulas prepuciais de animais tratados e controlos.

	Diâmetro dos grânulos perinucleares		Concentração dos grânulos perinucleares		Diâmetro das gotículas lipídicas	
	t	P	t	P	t	P
Machos controlos *vs.* Fêmeas controlos	1,50	$> 0,1$	1,11	$> 0,2$	4,48	$< 0,001$
Machos controlos *vs.* Machos orquidectomizados	0,75	$> 0,4$	0,03	$> 0,7$	5,83	$< 0,001$
Machos controlos *vs.* Machos inj. com estradiol	1,50	$> 0,1$	1,92	$> 0,05$	9,64	$< 0,001$
Machos controlos *vs.* Fêmeas inj. com testosterona	1,62	$> 0,1$	1,18	$> 0,05$	0,16	$> 0,7$
Fêmeas controlos *vs.* Fêmeas inj. com testosterona	0,12	$> 0,7$	2,88	$< 0,01$	6,75	$< 0,001$
Fêmeas controlos *vs.* Machos orquidectomizados	2,50	$< 0,02$	1,54	$> 0,1$	2,25	$< 0,05$
Fêmeas controlos *vs.* Machos inj. com estradiol	0,24	$> 0,7$	0,03	$> 0,7$	5,80	$< 0,001$
Machos inj. com estradiol *vs.* Machos orquidectomizados	2,43	$< 0,02$	1,63	$> 0,1$	4,00	$< 0,001$
Machos inj. com estradiol *vs.* Fêmeas inj. com testosterona	0,14	$> 0,7$	3,04	$< 0,01$	10,10	$< 0,001$
Machos orquidectomizados *vs.* Fêmeas inj. com testosterona	0,36	$> 0,7$	1,08	$> 0,2$	5,96	$< 0,001$

do que o apresentado pelos ratos fêmeas normais ($P < 0,05$), mas foi significativamente maior do que o dos ratos machos injectados com estradiol ($P < 0,001$) (Quadro 2).

No microscópio electrónico (Fig. 91), a morfologia fina das células secretoras dos ratos castrados mostrou-se semelhante à das células dos ratos machos injectados com estradiol.

No *estudo citoquímico* das células glandulares efectuado em cortes corados pelo método de Hayashi (1964) para a pesquisa da β-glucuronídase, não observámos entre os sexos e após qualquer das situações experimentais referidas, variações na intensidade da coloração vermelha da matriz dos grânulos perinucleares.

CITOLOGIA DO EPITÉLIO DOS CANAIS EXCRETORES

Canais excretores secundários

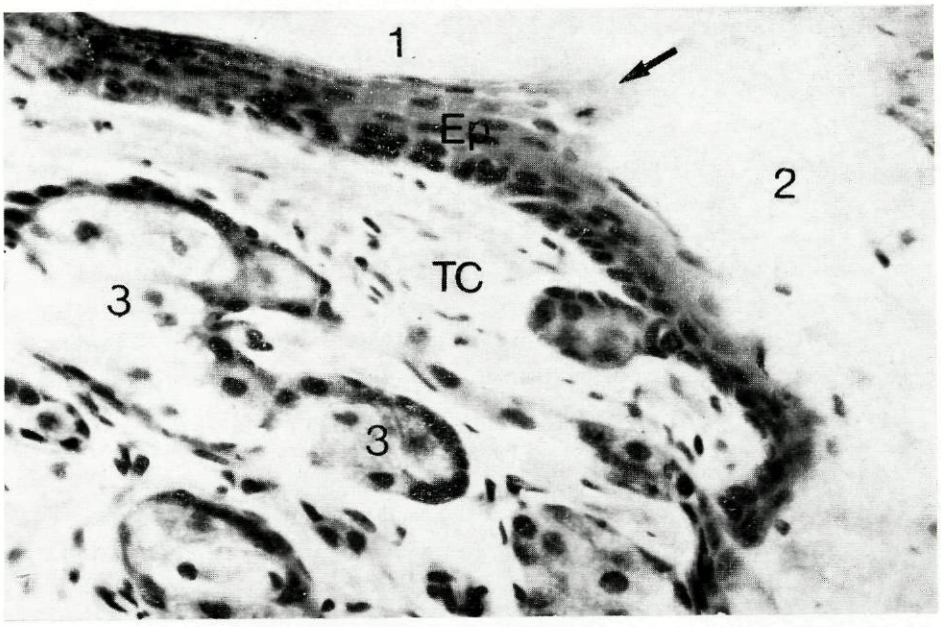
Microscopia de luz

A parede da porção dos canais excretores secundários contígua às unidades secretoras é constituída por epitélio pavi-

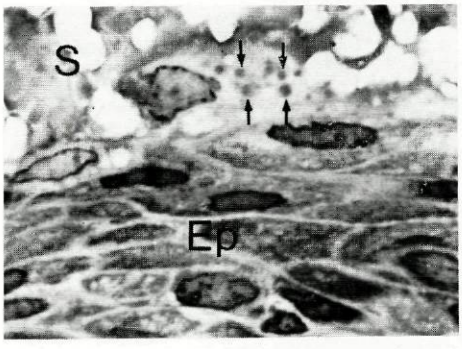
---

Fig. 92 — Epitélio de revestimento (Ep) do canal excretor principal (1) e de canal excretor secundário (2). Septo celular na transição entre os dois (seta). No epitélio do canal excretor secundário não se distinguem grânulos coráveis pela hemateína-eosina enquanto no do principal observam-se grânulos de queratohialina, basófilos. Ácinos (3) no estroma conjuntivo (TC). Fixação: líquido de Helly. Corte de parafina. Coloração: hemateína-eosina. 180 ×

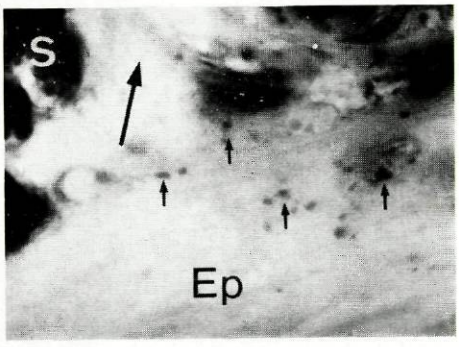
Figs. 93, 94, 95 e 96 — Citoquímica dos grânulos do epitélio de revestimento dos canais excretores secundários. Após coloração pelo PAS (Fig. 93) (1 200 ×) observam-se grânulos de cor vermelha, com ~ 0,8 μm de diâmetro (setas pequenas), no citoplasma claro das células superficiais. Com os métodos de Baker para os fosfolípidos (Fig. 94) (1 140 ×), de Barka e Anderson (1962) para a fosfátase ácida (Fig. 95) (960 ×) e de Hayashi (1964) para a β-glucuronídase (Fig. 96) (1 560 ×), assinalam-se (setas pequenas), com a mesma localização, disposição e tamanho, grânulos corados respectivamente de azul escuro, de preto e de vermelho (setas pequenas). Nas figuras 94 e 95 apontam-se (setas longas) septos celulares na confluência de canais excretores secundários. Na figura 96 vêem-se ainda, no sebo (S), grânulos com cristalóides não corados (seta grossa) e grande massa cristalóide (*) incolor.



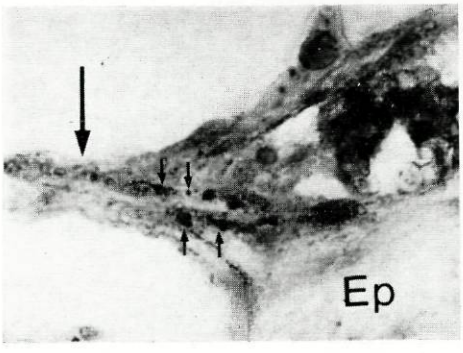
92



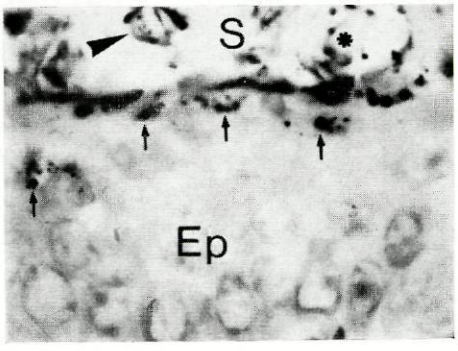
93



94



95



96

mentoso simples (Fig. 2). As suas células têm citoplasma moderadamente basófilo e núcleo vesiculoso e achatado, com cromatina fina reticulada e um ou dois nucléolos. À aproximação do canal excretor principal, o epitélio torna-se pavimentoso estratificado (Fig. 92). As células basais apresentam-se cúbicas e finalmente cilíndricas. As figuras de mitose são numerosas. Seguem-se-lhes uma a seis assentadas de células poliédricas, acidófilas, que se tornam achatadas à superfície. Estas últimas, após a coloração pelo PAS, mostram pequeno número de grânulos de cor vermelha, com cerca de 0,8 μm de diâmetro (Fig. 95). O teste de Baker cora de azul escuro grânulos com localização e dimensão semelhantes àqueles (Fig. 96). Com o método de Gomori para a fosfátase ácida (Fig. 97) e a reacção de Hayashi para a β-glucuronídase (Fig. 98), aparece actividade enzimática em grânulos com as mesmas características.

Nos canais de maior calibre, a assentada mais superficial é constituída por células ainda mais achatadas, com núcleos picnóticos, muitas das quais parecem destacar-se da parede epitelial (Fig. 92).

Microscopia electrónica

A morfologia fina das células basais é semelhante à das células basais das unidades secretoras (Fig. 97).

Na porção estratificada do epitélio, as células sobrepostas às basais contêm numerosos grânulos citoplasmáticos arredondados, revestidos por membrana de ~8 nm, com 0,21 ± 0,01 μm (D.P.M.) de diâmetro (100 medições), de conteúdo denso, frequentemente granuloso ou multivesicular (Figs. 97-100).

As células das camadas imediatamente mais superficiais, têm citoplasma de tonalidade clara sobretudo devido à escassez de ribosomas livres (Fig. 97). Observa-se nelas um tipo especial de grânulos mais volumosos, com cerca de 0,88 μm ± 0,05 (D.P.M.) de diâmetro (50 medições), revestidos por membrana de 8,70± 0,01 nm (D.P.M.) de espessura (50 medições), preenchidos por matriz densa interrompida por espaços claros

(Figs. 97 e 101). Habitualmente vêem-se um a seis grânulos deste tipo por corte de célula. Quando se efectua o método do ácido

---

Fig. 97 — Ultrastrutura do epitélio estratificado de canal excretor secundário. Sobrepostas às células basais (CB) observam-se células contendo corpos densos (setas pequenas), grânulos multigranulosos e multivesiculares (setas de tamanho médio) e grânulos mais volumosos, com espaços claros na matriz densa (setas grandes). No terço inferior da figura destaca-se, entre as células basais, uma célula clara (Cc) com pequenos grânulos citoplasmáticos (setas curtas). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 8 100 ×

Fig. 98 — Pormenor do citoplasma de célula diferenciada de canal excretor secundário evidenciando numerosos grânulos multigranulosos e multivesiculares (setas). Fixação e coloração como na figura anterior. 27 750 ×

Fig. 99 — Grande ampliação de grânulo multivesicular. Fixação e coloração como na figura 97. 85 400 ×

Fig. 100 — Grânulos multigranulosos (setas longas) e um multivesicular (seta curta) revestidos por membrana trilaminar. Fixação e coloração como na figura 97. 97 600 ×

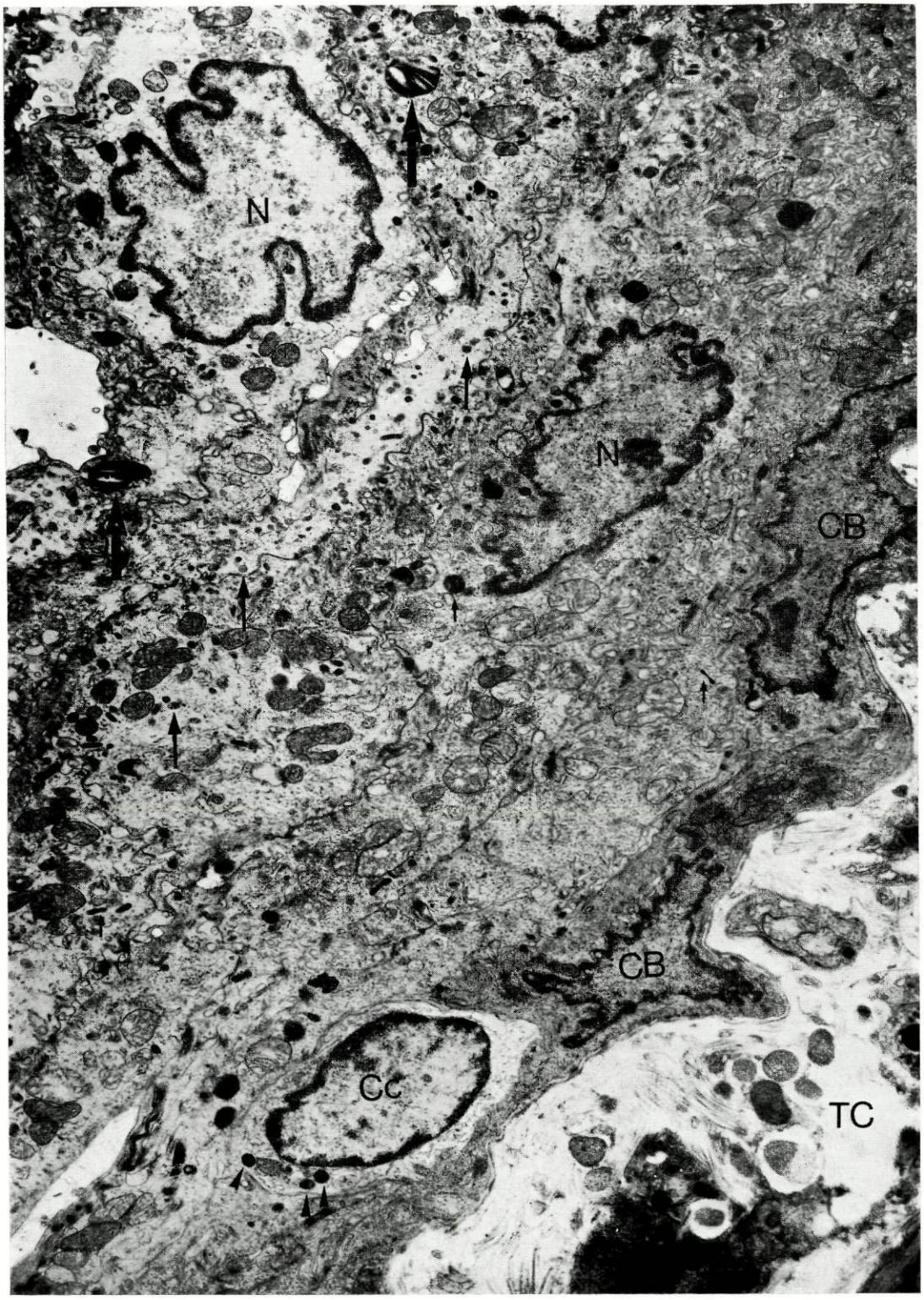
Fig. 101 — Célula superficial do epitélio de revestimento de canal excretor secundário mostrando grânulos citoplasmáticos com espaços claros na matriz densa. As setas apontam feixes de tonofilamentos cortados transversalmente. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 36 000 ×

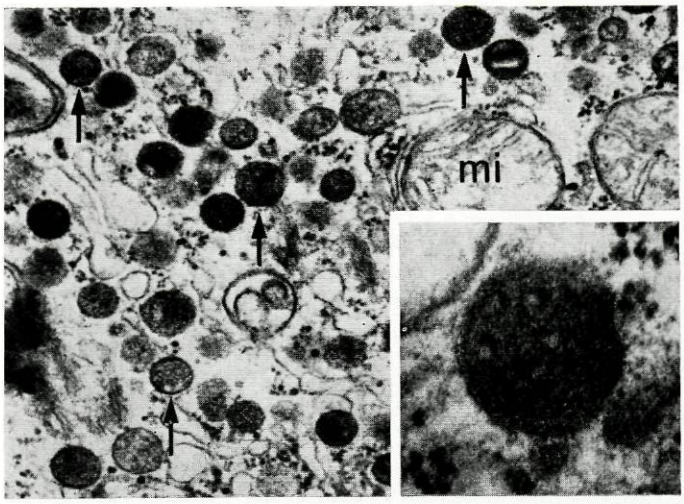
Fig. 102 — Grânulos do mesmo tipo dos da figura anterior com matriz corada pela metenamina-prata e espaços claros incolores. Fixação: glutaraldeído. Coloração: metenamina-prata sem oxidação prévia pelo ácido periódico. 19 000 ×

Fig. 103 — No centro da figura observa-se citoplasma de célula superficial de canal excretor secundário, com banda marginal na periferia (setas curtas), mitocôndrias de matriz densa (setas finas) e volumoso agregado de corpos autofágicos (CA) de contorno multilamelar e de conteúdo denso e granuloso. No sebo (S), assinalam-se grandes massas cristalóides (GMC), corpos autofágicos (CA) e uma gotícula lipídica (L). No terço inferior da figura vê-se célula contendo grânulos densos com espaços claros na matriz (setas longas). Fixação: glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 12 000 ×

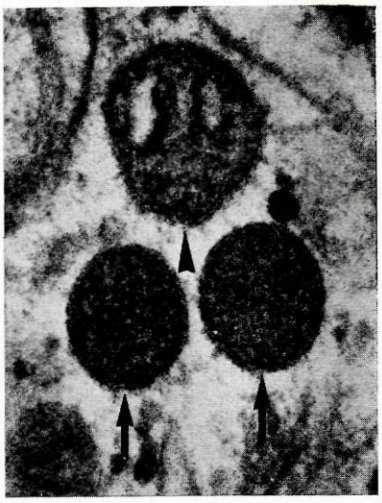
Fig. 104 — Núcleo da célula descrita na figura anterior. De configuração irregular e achatada, apresenta acentuação da densidade dos grânulos de cromatina e aumento do número e volume dos grânulos intercromatínicos (setas finas). Na periferia celular distingue-se banda marginal (setas curtas) e um desmosoma com tonofilamentos aderentes (seta longa). Fixação e coloração como na figura anterior. 21 600 ×

Fig. 105 — Células córneas (CC) da superfície do epitélio de revestimento de grande canal excretor secundário. Estas células aparecem preenchidas por complexo amorfo-filamentoso e apresentam banda marginal, densa, na periferia (setas curtas). Numa delas observam-se restos nucleares de configuração irregular (*). Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 103. 42 000 ×

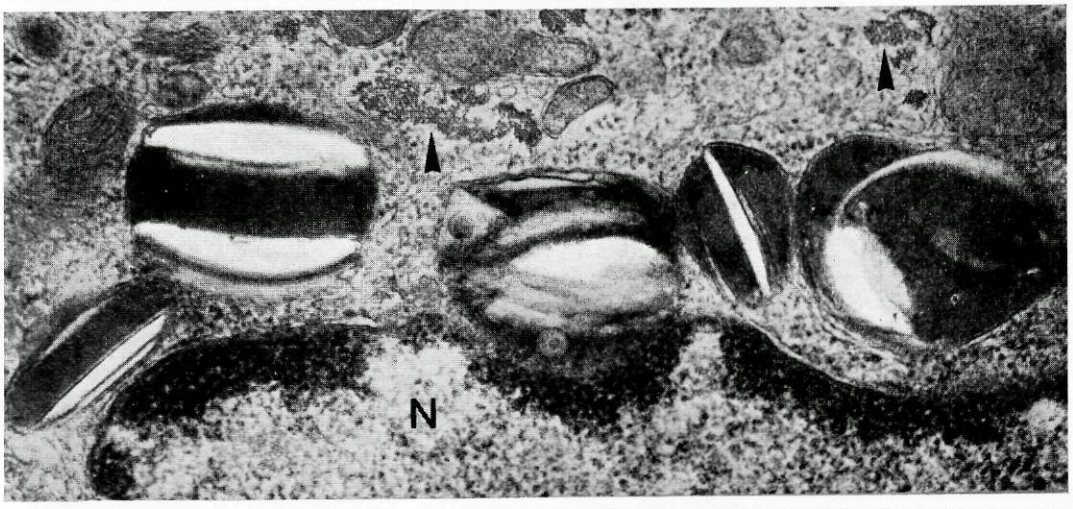

N
N
CB
CB
CC
TC



98



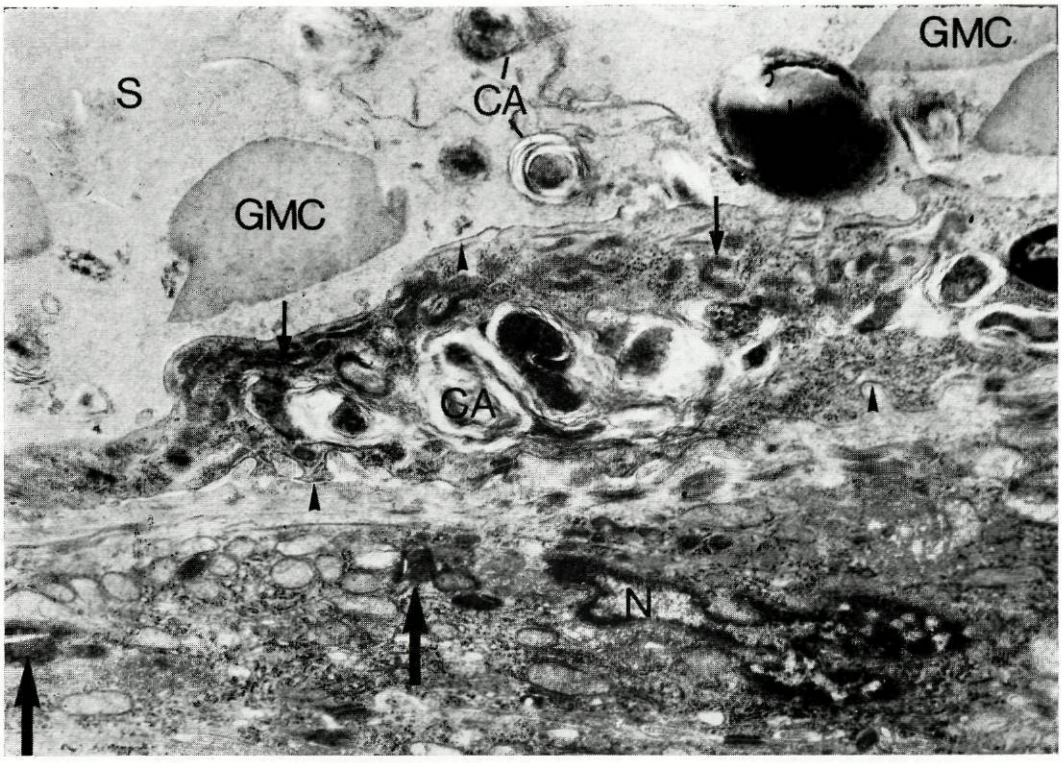
100



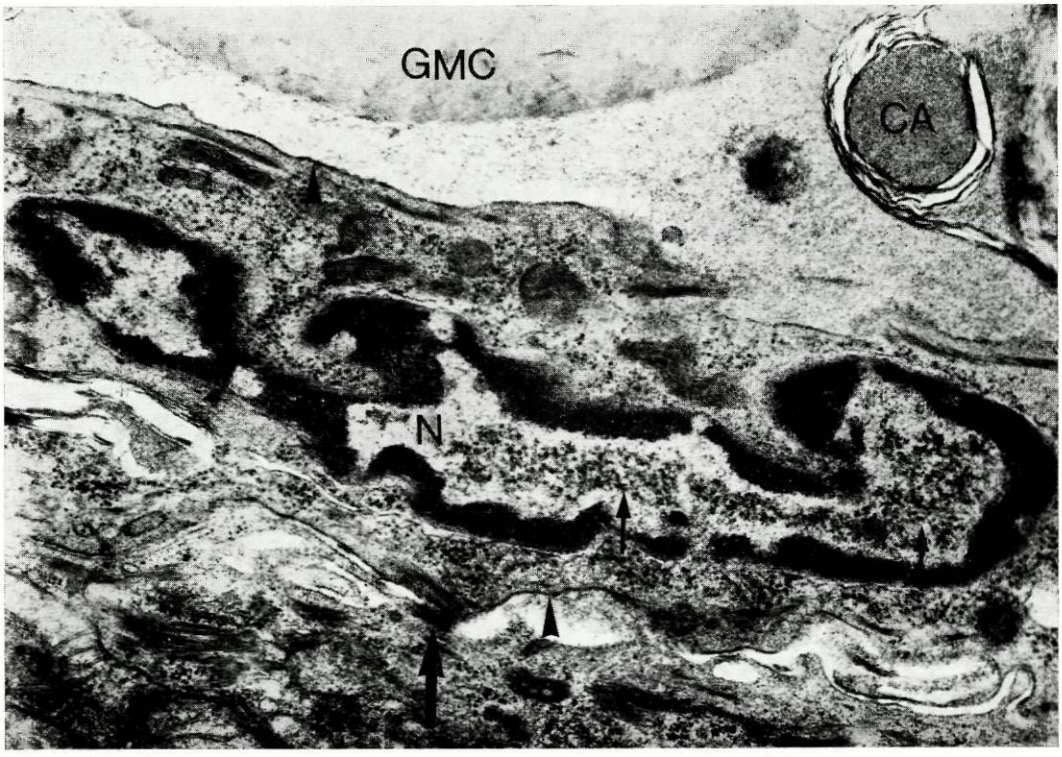
101



102



103



104


CC
CC
CC
CC

periódico/metenamina-prata em cortes ultrafinos de peças fixadas em glutaraldeído, a matriz cora intensamente mesmo em cortes não oxidados, enquanto os espaços claros permanecem incolores (Fig. 102).

Na maioria dos canais excretores secundários as células atrás descritas constituem a assentada de células próximas do lúmen. Contudo, nos mais volumosos, as células superficiais são mais achatadas e a membrana plasmática apresenta-se reforçada internamente por banda contínua de material denso com ~ 17 nm de espessura (Figs. 103 e 104). O núcleo contém massas cromatínicas densas à periferia e aglomerados distintos de grânulos intercromatínicos (Fig. 104). No citoplasma assinalam-se áreas parcialmente revestidas de membrana, de conteúdo heterogéneo, onde avultam figuras mielínicas e restos de organelos (Fig. 103). Estas células apresentam-se, com frequência, parcial ou totalmente destacadas no sebo.

Finalmente, junto da desembocadura do canal excretor principal, surgem, sobrepostas às anteriores, células ainda mais achatadas, com morfologia fina semelhante à das células córneas do tipo A dos canais excretores principais (Fig. 105).

Canal excretor principal

Microscopia de luz

As células da *camada basal* são cilíndricas e têm citoplasma moderadamente basófilo. Há frequentes figuras de mitose. Na porção extraglandular (Fig. 106), as células são altas, contêm numerosas gotículas sudanófilas e estão separadas por espaços mais dilatados do que na porção intraglandular. A *camada espinhosa* consiste em 3-4 assentadas de células na porção intraglandular e 5-7 na extraglandular. Na *camada granulosa as* células contêm grânulos fortemente basófilos (Figs. 56 e 92), positivos à reacção do DDD (Fig. 108), cuja frequência aumenta proximalmente. A *camada córnea* é constituída por células achatadas, acidófilas, anucleadas. Na porção intraglandular assina-

lam-se 1-3 assentadas (Figs. 5 e 108) enquanto na porção mais distal do canal extraglandular chegam a contar-se 8.

Microscopia electrónica

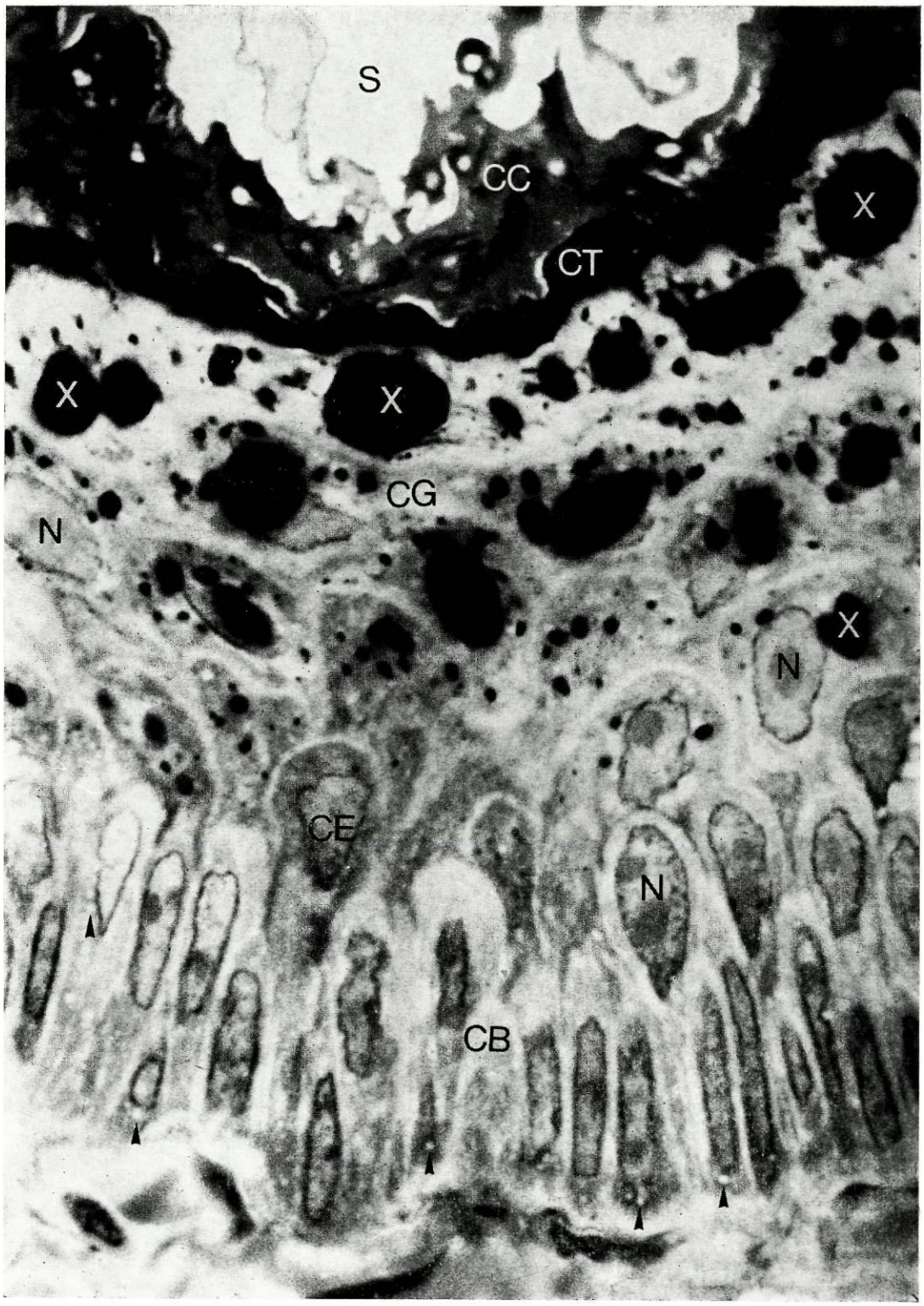
Camada basal — A morfologia celular fina pouco difere da observada nas células basais dos canais excretores secundários ou dos túbulo-ácinos. As microvilosidades são, porém, muito abundantes e longas, sobretudo na porção extraglandular. Acresce ainda que é muito maior a densidade dos ribosomas livres e dos feixes de tonofilamentos (Figs. 117 e 120).

Camada espinhosa — Nas células espinhosas não se encontram centríolos e é menor a concentração dos ribosomas livres do que nas células basais. No citoplasma das células mais superficiais (Fig. 107), vêem-se múltiplos grânulos do tipo dos *membrane coating granules* (MCG) (Matoltsy e Parakkal, 1965), medindo 0,2 a 0,5 μm de comprimento e 0,1 μm de largura, de interior septado por lamelas densas, paralelas, perpendiculares ao maior eixo do grânulo (Fig. 112).

Camada granulosa — As células granulosas apresentam no seu contorno múltiplos desmosomas, numerosas microvilosidades curtas e feixes de tonofilamentos densamente agrupados (Figs. 107 e 109). Os núcleos das células mais afastadas da camada espinhosa contêm, nas áreas intercromatínicas, grânulos densos arredondados, com $0{,}29 \pm 0{,}02$ μm (D.P.M.) de diâmetro (50 medições) (Fig. 109). No citoplasma, observam-se, além de grande número de *membrane coating granules* (MCG),

---

Fig. 106 — Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da porção extraglandular do canal excretor principal. Células basais (CB), espinhosas (CE), granulosas (CG), célula de transição (CT) e células córneas (CC). Nas células basais observam-se abundantes vacúolos arredondados, incolores, correspondentes a gotículas lipídicas (setas curtas). Na camada granulosa, os grânulos de queratohialina (X) são sobretudo volumosos nas células mais superficiais. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Corte de 1 μm de espessura. Coloração: ácido peracético-hematoxilina. 2 160 ×

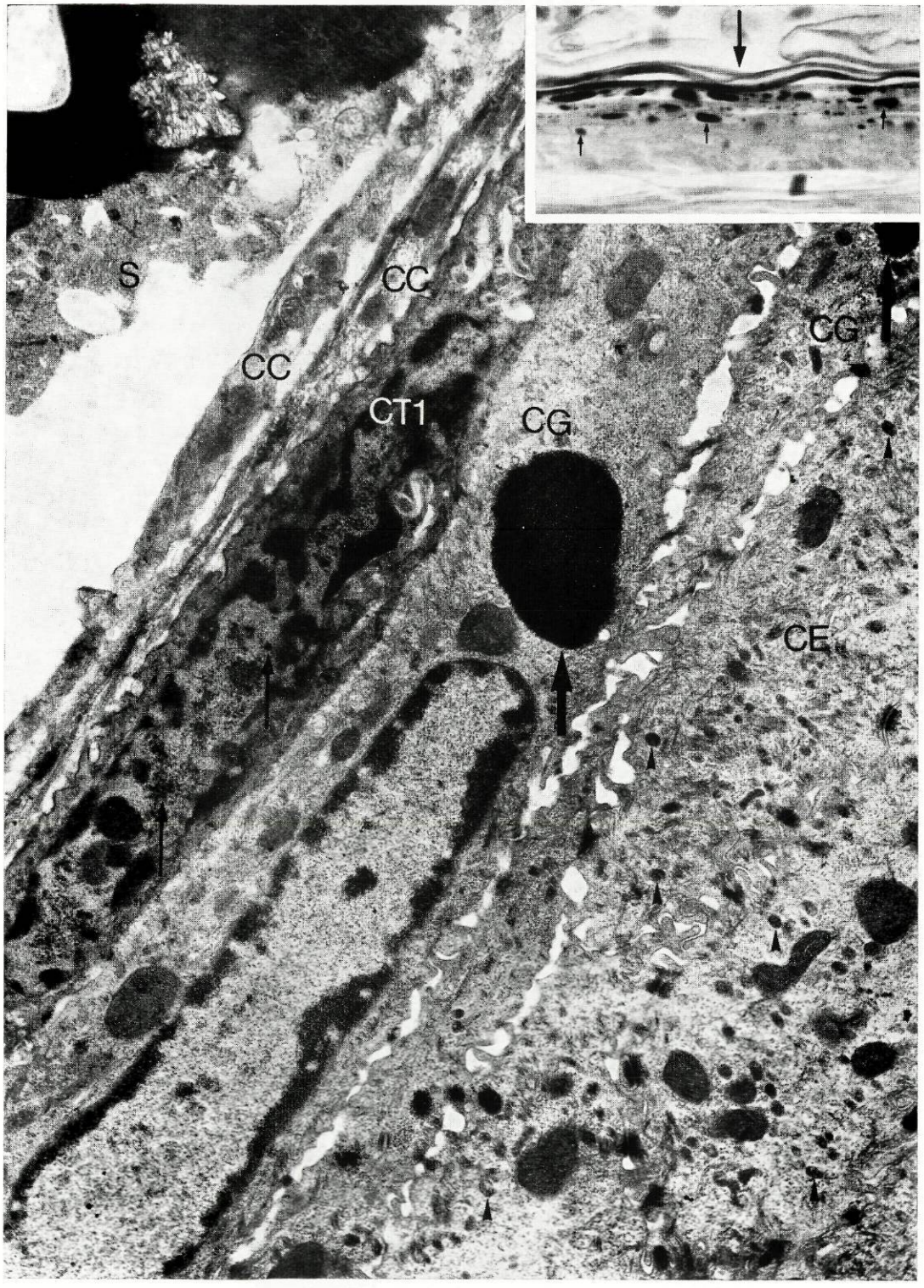

S
CC
X
CT
X
X
CG
N
X
N
CE
N
CB

frequentemente justapostos (Fig. 112) ou fundidos com a membrana celular (alguns mostram actividade fosfatásica ácida positiva, Fig. 113), grânulos de queratohialina de diverso tamanho. Uns, pequenos e arredondados, aparecem nas células mais profundas. Outros, geralmente maiores, apresentam tonofilamentos aderentes Finalmente, nas células mais superficiais, observam-se grandes grânulos em cuja periferia se distinguem, por vezes, grânulos mais pequenos, redondos, com 0,23 ± 0,09 μm (D.P.M.) de diâmetro (50 medições)), morfologicamente idênticos aos grânulos intranucleares (Fig. 109). Em cortes ultrafinos de peças fixadas em glutaraldeído/tetróxido de ósmio, os grânulos intranucleares e os da periferia dos grandes grânulos desvanecem-se completamente após oxidação com um soluto aquoso de ácido periódico a 10 p. 100 durante 20-30 minutos (Fig. 110). Nas mesmas condições, a matriz dos três tipos de grânulos apenas sofre diminuição da electrono-opacidade (Fig. 110). A digestão subsequente dos cortes, durante 15 minutos, com um soluto aquoso de prónase a 0,5 p. 100, faz desaparecer a densidade da queratohialina (Fig. 111).

Fig. 107 — Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado da porção intraglandular do canal excretor principal. Células espinhosas (CE) com numerosos *membrane coating granules* (MCG) (setas curtas), granulosas (CG) com grânulos de queratohialina (setas longas) e célula de transição (CT1) com núcleo de configuração irregular, contendo abundantes grânulos intercromatínicos (setas finas) e cromatina em massas compactas. Células córneas (CC) adjacentes ao sebo (S). Fixação como na figura anterior. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 15 000 ×

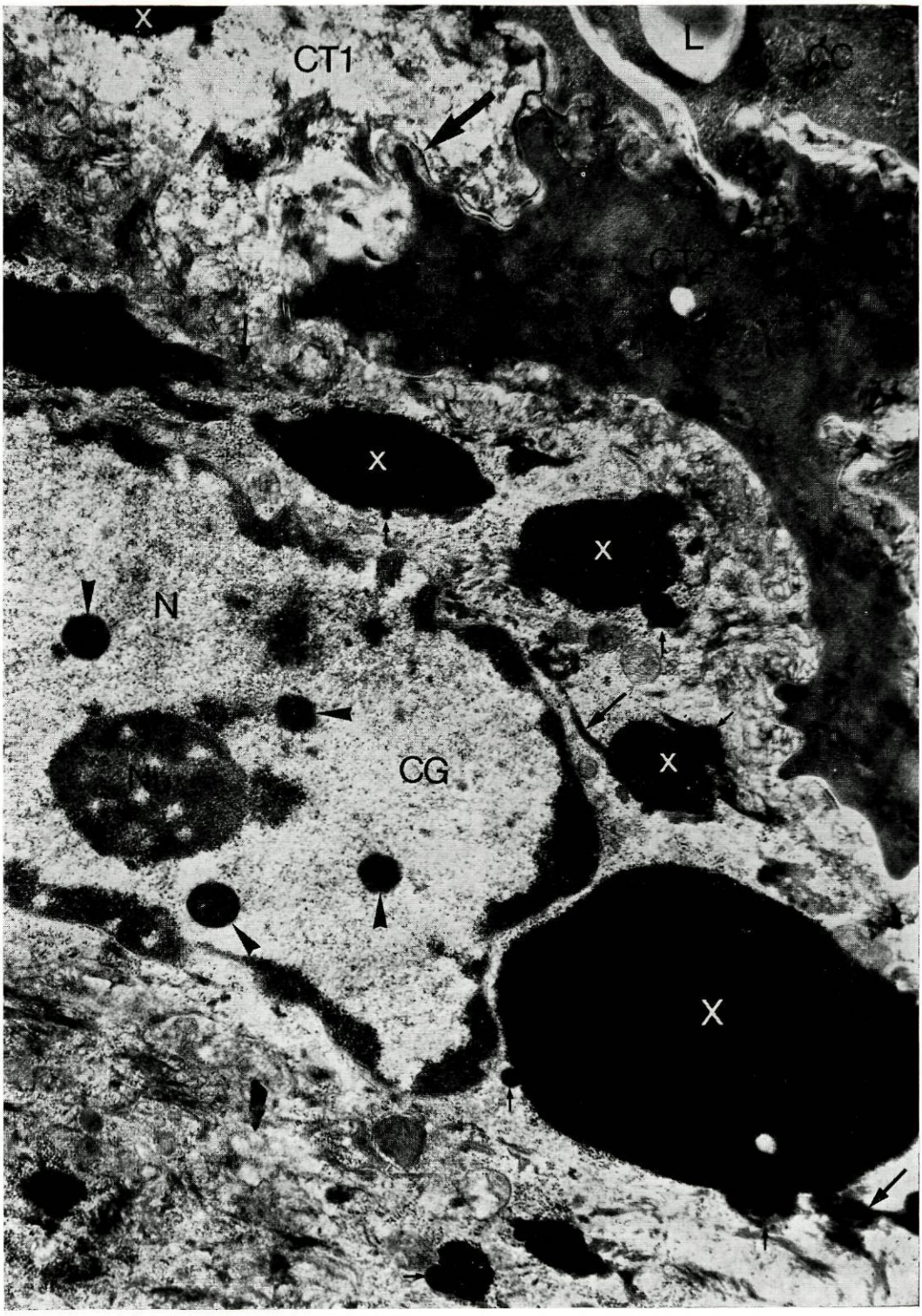
Fig. 108 — Corte longitudinal da porção intraglandular do canal excretor principal, corado pelo método do DDD de Barrnett e Seligman após redução pelo ácido tioglicólico. Os grânulos de queratohialina (setas pequenas) e as células córneas (seta longa) coram de vermelho-acastanhado. Fixação: líquido de Helly. Corte de parafina. 164 ×

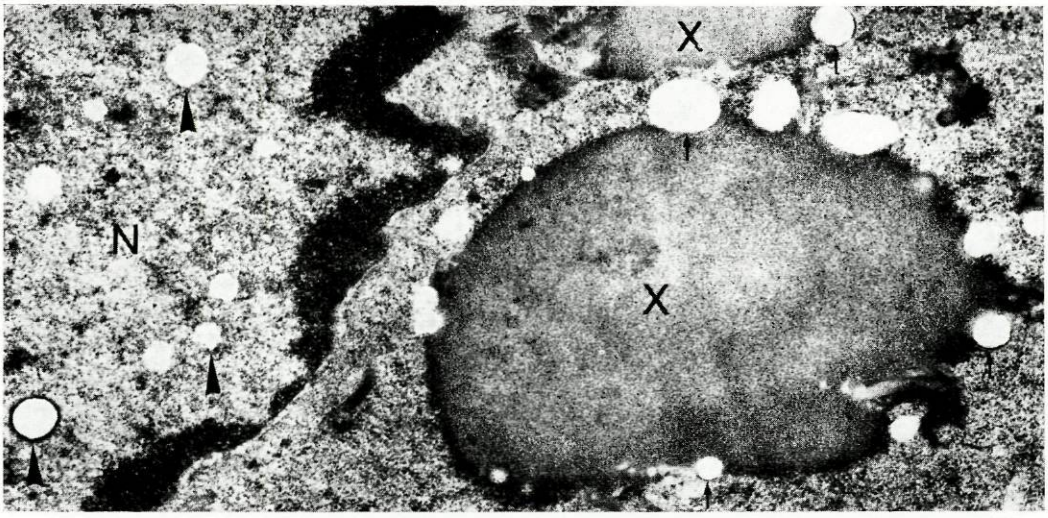
Fig. 109 — Célula granulosa (CG) evidenciando grânulos de queratohialina (X) com pequenos grânulos arredondados, densos (setas pequenas) e tonofilamentos (setas de tamanho médio), na periferia. No núcleo da célula observam-se grânulos igualmente arredondados, densos (setas curtas). No terço superior da figura distinguem-se células de transição (CT1 e CT2) e uma célula córnea (CC). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 16 800 ×



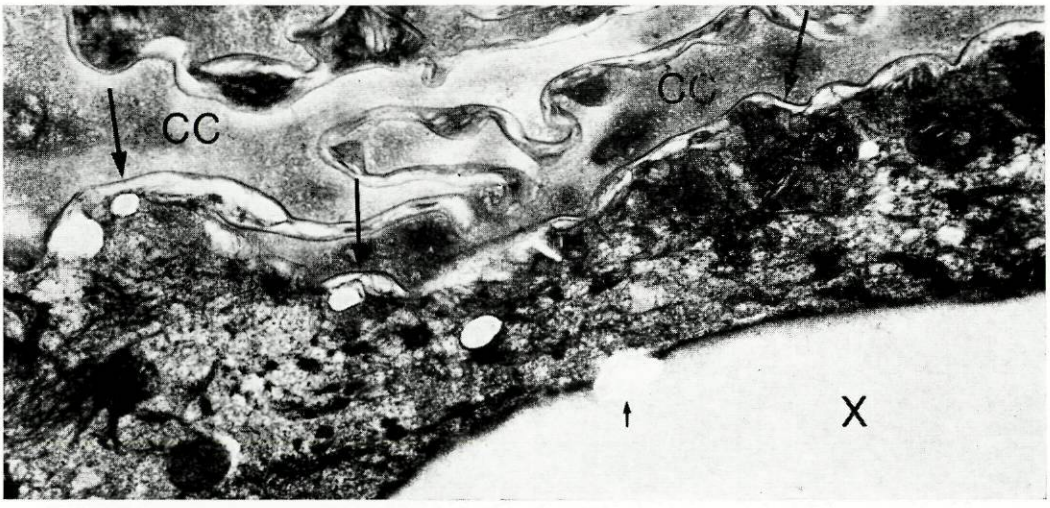
107

108

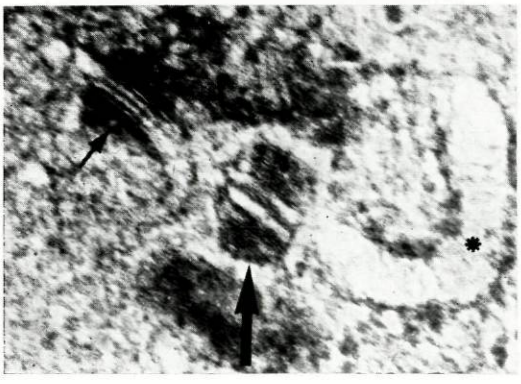

X
CT1
L
CC
CT2
X
X
N
CG
X
X



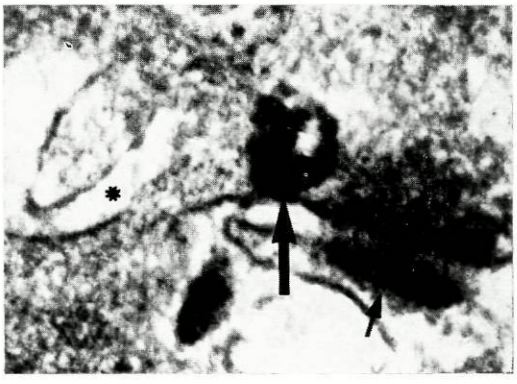
110



111



112



113

Células de transição — Entre as células granulosas e as córneas observam-se *células de transição,* das quais, as mais próximas da camada granulosa, têm citoplasma claro, abundantes tonofilamentos e escassos organelos e ribosomas livres (Fig. 109, *CT1).* Os grânulos de queratohialina são volumosos e os MCG raros (Fig 109). Por dentro da membrana plasmática nota-se banda densa com cerca de 17 nm de espessura (Fig. 109). O núcleo está íntegro ou exibe acentuação da densidade das massas cromatínicas e grupos irregulares de grânulos intercromatínicos (Fig. 107). As células mais superficiais têm

---

Fig. 110 — A oxidação dos cortes ultrafinos, por um soluto aquoso de ácido periódico a 10 p. 100, durante 30 minutos, desvanece a densidade dos grânulos intranucleares (setas curtas) e dos pequenos grânulos (setas pequenas) da periferia dos grânulos de queratohialina (X). A densidade destes aparece apenas diminuída. Fixação e coloração como na figura anterior. 19 800 ×

Fig. 111 — A digestão dos cortes ultrafinos, por um soluto aquoso de prónase a 0,5 p. 100, durante 15 minutos, extraiu o conteúdo dos grânulos de queratohialina (X). A oxidação, que antecedeu a digestão, desvaneceu os pequenos grânulos da sua periferia (seta pequena). A densidade da banda marginal (setas longas) das células córneas (CC) não foi afectada. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 109. 19 000 ×

Fig. 112 — *Membrane coating granule* (MCG) (seta longa), com típica estrutura lamelar, na periferia de célula granulosa. Desmosoma (seta pequena) e espaço intercelular (*). Fixação e coloração como na figura anterior. 102 000 ×

Fig. 113 — Imagem idêntica à da figura anterior mostrando *membrane coating granule* (MCG) (seta longa) com actividade de fosfátase ácida no interior. Fixação: glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio. Pesquisa de fosfátase ácida pelo método de Etherton e Botham (1970); incubação de 15 minutos. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 120 000 ×

Fig. 114 — Células, granulosa (CG), de transição (CT2) e córnea (CC). Na de transição observa-se banda marginal (setas pequenas) e formações densas (X), de contornos esbatidos, correspondentes, provavelmente, a grânulos de queratohialina em transformação. No espaço intercelular, entre esta célula e a córnea, há grande quantidade de material lamelar (setas curtas) resultante da expulsão do conteúdo dos MCGs. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura anterior. 30 000 ×

Fig. 115 — Núcleo alterado, de célula de transição (CT2) com resto de membrana nuclear (seta curta), massas cromatínicas amorfas (setas longas) e grupos de grânulos intercromatínicos volumosos (setas pequenas). Banda marginal na periferia da célula (seta larga). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 113. 43 000 ×



114



115

citoplasma denso e filamentoso (Figs. 109, 114 e 115, *CT2)* contendo, por vezes, figuras mielínicas; observa-se banda marginal (Figs. 114 e 115). Os grânulos de queratohialina são pouco densos e de contornos mal definidos (Fig. 114, *X)*. O núcleo apresenta apenas restos da membrana (Fig. 115) e fusão parcial e homogeneização das massas cromatínicas (Fig. 115). Lamelas membranosas, provavelmente oriundas dos MCG, vêem-se frequentemente acumuladas em reentrâncias da periferia das células de transição dos dois tipos (Fig. 114).

Camada córnea — As células córneas são anucleadas (embora em alguns casos se notem fragmentos de núcleos desprovidos de membrana e com a cromatina condensada) e apresentam banda marginal típica que permanece densa após oxidação pelo ácido periódico ou subsequente digestão pela prónase a 0,5 p. 100 durante 15 minutos (Fig. 111). Em peças fixadas pelo glutaraldeído-peróxido de hidrogénio/tetróxido de ósmio observámos desvanecimento da sua electrono-opacidade.

Quanto ao citoplasma, há dois tipos de células córneas. Umas, mais escuras (tipo A), têm citoplasma totalmente preenchido por feixes de filamentos densamente agrupados (Figs. 107, 109, 111 e 116). As outras, mais claras (tipo B), contêm, entre os feixes de filamentos, espaços por vezes volumosos, de hialoplasma transparente (Figs. 114 e 116). Ambas contêm abundantes gotículas lipídicas.

As células estão separadas por espaços sinuosos, habitualmente dilatados, em parte ocupados por material amorfo e lamelar, denso (Figs. 111 e 116).

Fig. 116 — Células córneas do tipo A (com citoplasma preenchido por feixes de filamentos densamente agrupados) e do tipo B (com numerosos espaços de hialoplasma transparente entre os feixes de filamentos). As gotículas lipídicas (L) são frequentes. Nos espaços intercelulares observa-se material amorfo e lamelar, electrono-opaco. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 113. 12 400 ×


L
B
L
A
B
A
L

CÉLULAS CLARAS

Na camada basal do epitélio dos canais excretores (Figs. 97 e 117) e entre as células basais das unidades secretoras (Fig. 118), vêem-se algumas células com características morfológicas particulares. Designámo-las por *células claras* dada a escassa densidade do seu citoplasma quando observadas no microscópio electrónico. Aumentam de frequência em direcção ao meato prepucial.

Em cortes de parafina corados pela hemateína-eosina não se distinguem das células basais dos canais e dos túbulo-ácinos. Com o PAS, todavia, o seu citoplasma é incolor (Fig. 118). O mesmo sucede com a coloração pelo ácido peracético em cortes finos (1-2 μm) de Epon. Alongadas em sentido perpendicular à base do epitélio nos grandes canais excretores, são paralelas à mesma linha de base nos canais mais pequenos e nas unidades secretoras (Figs. 97 e 119). A reacção-DOPA é negativa. Não fixam o azul do trípano injectado por via endovenosa.

Ao microscópio electrónico as células claras apresentam contorno irregularmente ovóide e microvilosidades curtas nos túbulo-ácinos e mais longas à medida que aumenta o diâmetro dos canais excretores (Fig. 117). As células estão frequentemente separadas da lâmina basal pelo citoplasma das células epiteliais vizinhas. Neste caso, as microvilosidades insinuam-se entre estas células e contactam com a lâmina basal (Fig. 117). Na periferia das células claras observam-se poucas vesículas de micropinocitose e nenhuns desmosomas. O núcleo, de contorno denteado, contém grandes massas cromatínicas densas (Figs. 117 e 118) e um ou dois nucléolos com nucleolonemas típicos. O citoplasma caracteriza-se pela escassez de organelos. Os ribosomas e os polirribosomas livres são pouco numerosos embora difiram na concentração de célula para célula. As cisternas do retículo endoplásmico rugoso são escassas e não empilhadas (Fig. 117). As mitocôndrias, pouco numerosas, têm matriz clara com cristas lineares e angulosas e tendem a agrupar-se em torno do núcleo (Fig. 119). Junto deste

assinalam-se também, por vezes, volumosos complexos de Golgi (Fig. 120). Vêem-se ainda túbulos de parede lisa, alguns filamentos isolados de ~7 nm de diâmetro e ocasionais gotículas lipídicas. Os centríolos são frequentes (Fig. 120). Habitualmente observam-se pequenos grânulos revestidos por membrana, redondos ou alongados, com 0,1-0,5 μm de diâmetro máximo, de matriz densa, geralmente de 0-6 por corte de célula (Figs. 97, 117 e 121). Nalgumas células vimos extensas áreas rodeadas de membrana, de conteúdo heterogéneo constituído por figuras mielínicas, ribosomas e massas densas mal definidas (Figs. 121 e 122). Estas células exibem, com frequência, longos pseudópodes que parecem envolver porções de células epiteliais vizinhas (Fig. 121).

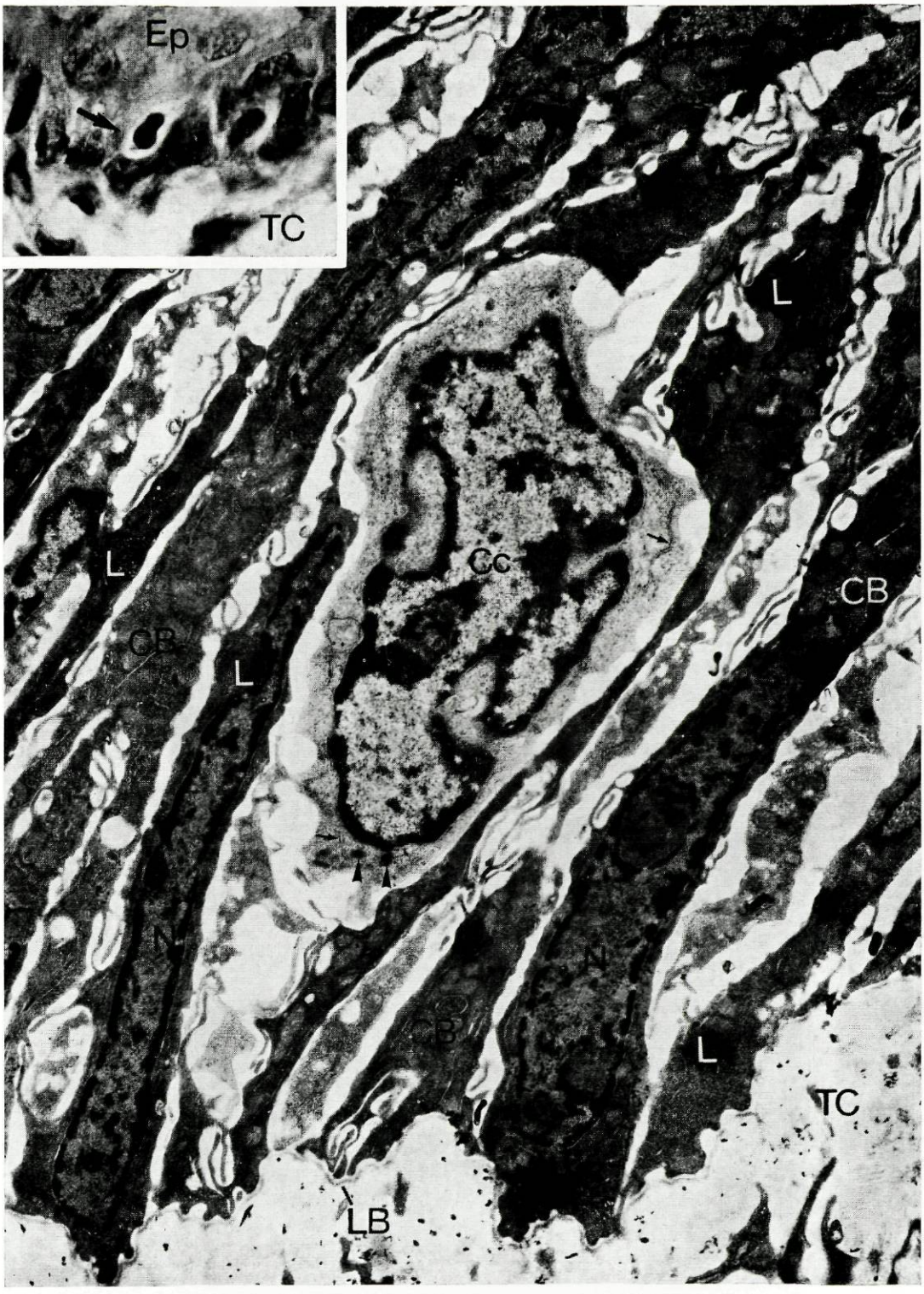
Fig. 117 — Célula clara (Cc) no epitélio de revestimento da porção extraglandular do canal excretor principal. De configuração irregularmente ovóide, apresenta numerosas microvilosidades e citoplasma com alguns pequenos grânulos densos (setas curtas) e cisternas isoladas do retículo endoplásmico rugoso (setas pequenas). As células basais (CB) do epitélio têm igualmente numerosas e extensas microvilosidades, núcleo (N) alongado e citoplasma denso, rico em ribosomas livres e em gotículas lipídicas (L). Fixação e coloração como na figura anterior. 11 200 ×

Fig. 118 — Célula clara (seta), com citoplasma incolor, na camada basal de epitélio de revestimento (Ep) de canal excretor principal. Fixação: formol a 4 p. 100 (7 dias à temperatura ambiente). Corte de parafina. Coloração: PAS + hematoxilina. 1 260 ×

Fig. 119 — Célula clara (Cc) no interior de ácino glandular. No citoplasma observam-se ribosomas e polirribosomas livres disseminados (r) e grupo de mitocôndrias (mi) com disposição justanuclear. O núcleo mostra massas cromatínicas volumosas. Na periferia da célula vêem-se microvilosidades (setas longas) que contactam, nalguns pontos, com a lâmina basal (LB). No canto superior esquerdo da figura nota-se célula secretora diferenciada com grânulos perinucleares de matriz densa (C). Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 15 600 ×

Fig. 120 — Parte de célula clara (Cc) evidenciando pequeno número de ribosomas livres (r), volumoso complexo de Golgi (Go) e um centríolo (seta). No canto superior esquerdo da figura observam-se células basais (CB) do canal excretor principal. Fixação e coloração como na figura anterior. 50 400 ×

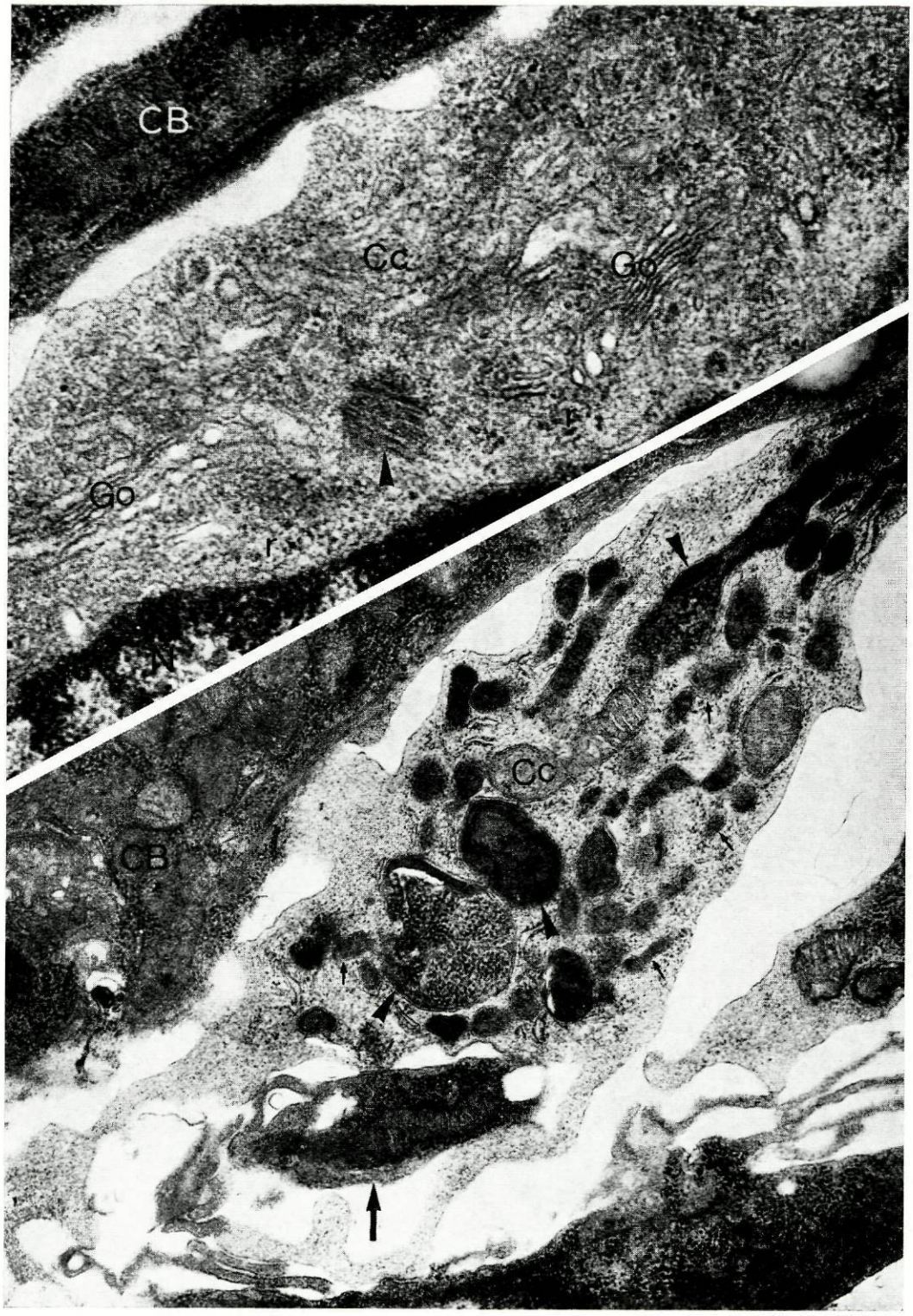
Fig. 121 — Célula clara (Cc) com numerosos pequenos grânulos densos (setas pequenas) e vesículas (setas curtas) contendo figuras mielínicas e ribosomas de dimensões iguais às dos ribosomas das células basais vizinhas (CB). A seta longa aponta porção de célula epitelial do canal excretor principal envolta por prolongamentos citoplasmáticos da célula clara. Fixação: glutaraldeído/tetróxido de ósmio. Coloração como na figura 119. 23 000 ×



118

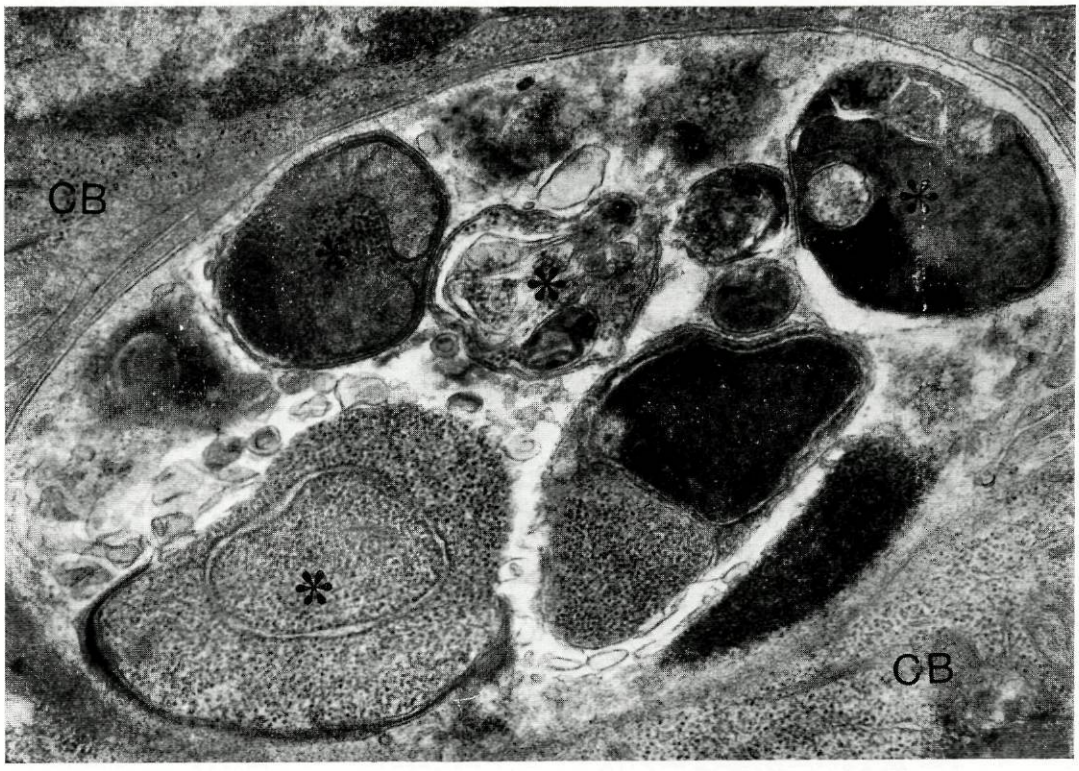
117


L
C
N
Cc
N
r
mi
LB
TC



120

121



122

Fig. 122 — Citoplasma de célula clara mostrando, com maior ampliação, corpos de inclusão (*) contendo ribosomas, organelos alterados e novelos de membranas. Fixação e coloração como na figura anterior. 26 000 ×

DISCUSSÃO

RENOVAÇAO DAS CÉLULAS SECRETORAS

A existência de células basais que se dividem originando células que se diferenciam mas não se dividem, é facto comum às glândulas sebáceas cutâneas (Montagna, 1963 a, b) e às prepuciais do rato (Montagna e Noback, 1946; Pannese, 1954; Beaver, 1960; Dangelo e Munger, 1964). Nestas, porém, as células basais dos ácinos têm maior actividade mitótica do que as que revestem o restante contorno da unidade secretora. Esta dualidade parece explicar a configuração túbulo-acinosa das unidades secretoras destas glândulas, dado que a maior proliferação das células basais de certas zonas da periferia do túbulo leva, naturalmente, à formação local de ácinos. Não dispomos, no entanto, de elementos que permitam conhecer a causa do despertar dessas células basais para um ritmo de divisão mais activo. Interessa ainda precisar que apenas existem células em início de diferenciação nos ácinos. Assim, as restantes células basais da parede do túbulo dão origem, certamente, a outras células basais mas não a células que se diferenciem.

A proliferação das células basais nos ácinos das glândulas prepuciais do rato adulto é mais lenta do que nas glândulas sebáceas cutâneas da mesma espécie. Enquanto registámos um índice mitótico de 2,70 p. 100 nas primeiras, Bertalanffy

(1957) obteve um índice de 4,12 p. 100 para as segundas. Os dois resultados são comparáveis visto que em ambos os casos se utilizou a administração de colquicina e se fizeram contagens das mitoses no fim de um período de 6 horas, entre as 10 e as 16 horas do dia. Dado que, segundo Bullough (1948, 1950), Storey e Leblond (1951) e Bertalanffy (1957), esse é o período de actividade mitótica mais intensa na epiderme e nas glândulas sebáceas, o índice mitótico máximo nas glândulas prepuciais deverá ser de 10,80 p. 100 nas 24 horas (2,70 p. 100×4), pelo que o tempo necessário para a renovação total *(turnover time)* das células basais dos ácinos é de, pelo menos, 9,2 dias. É curioso notar que Pannese (1954) contara já, nestas glândulas, 9,0, 7,3 e 4,5 núcleos em mitose em 1 000 células de ácinos pequenos de ratos com 25 dias, 35 dias e 1 ano de idade, respectivamente. Não efectuou, porém, a injecção de colquicina o que diminui o rigor a este tipo de investigação numa glândula cujo número de mitoses é baixo.

A proliferação celular nas glândulas sebáceas cutâneas foi também estudada no homem, por meio de autorradiografia de timidina tritiada, injectada na imediação das glândulas (Plewig *et al.*, 1971). Estes autores concluiram que existiam dois tipos de células em proliferação: *a)* células basais localizadas no fundo dos ácinos, às quais chamaram, juntamente com as células diferenciadas vizinhas, *reserva de células em diferenciação (DCP)* e b) células desprovidas de gotículas lipídicas, situadas na transição dos ácinos para os canais excretores *(reserva de células não diferenciadas — UCP)*. Este último compartimento apresentava um índice de marcação duplo do do primeiro.

Há uma certa similitude entre as células do compartimento não diferenciado de Plewig *et al.* (1971) e as células basais dos túbulos das glândulas prepuciais do rato, no que se refere à localização na vizinhança dos canais excretores. Igualmente são semelhantes, na localização e no destino, as células basais de Plewig *et al.* (1971) e as células basais dos ácinos das glândulas prepuciais. Há, todavia, uma divergência fundamental no facto de que, nestas glândulas, são as células basais dos ácinos

as que se dividem mais activamente e não as dos túbulos. A este propósito, efectuámos tentativas de marcação das glândulas prepuciais por meio de injecção local com timidina-^{3}H. A acentuada desigualdade de incorporação de uns lóbulos para outros, consequência aparente de variações na absorção, levaram-nos, contudo, a pôr de parte este método e a preferir-lhe a determinação do índice mitótico com administração sistémica de colquicina. Este processo forneceu-nos valores numéricos muito aproximados entre os dois animais e escassa variação entre os diversos lóbulos da glândula, pelo que nos pareceram de maior confiança do que os que obtivemos com a timidina.

DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SECRETORAS

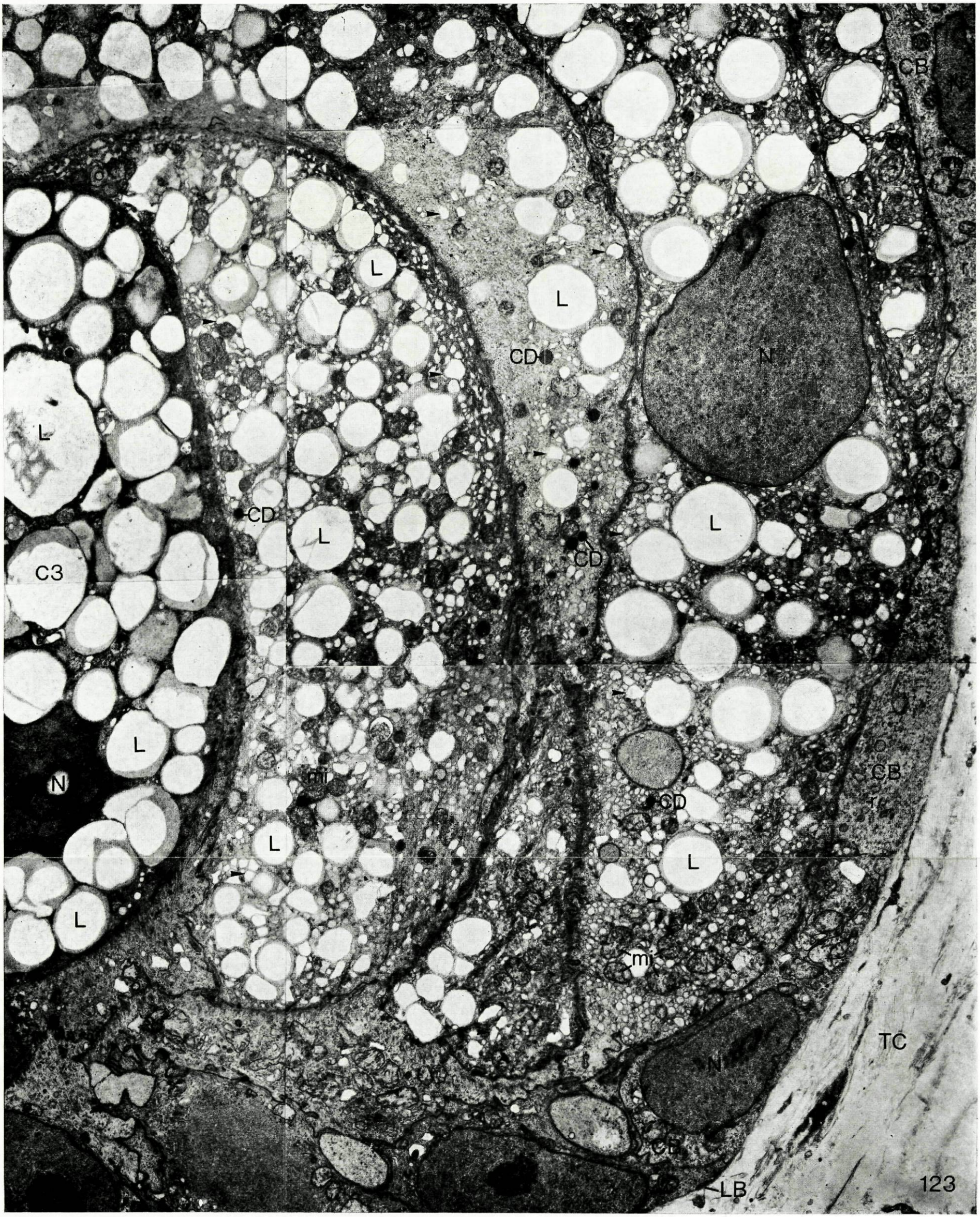
As células basais dos ácinos contêm já a maior parte dos organelos presentes nas células em diferenciação, possuindo assim o essencial da maquinaria subcelular que, subsequentemente, tomará parte nos processos de secreção. Merecem particular destaque o grande número de ribosomas e de polirribosomas livres, as cisternas, por vezes dilatadas, do retículo endoplásmico parcialmente revestidas de ribosomas e o bem desenvolvido complexo de Golgi com abundante proliferação de vesículas pequenas. Os corpos densos, de 0,15—0,50 μm de diâmetro, são idênticos e em número aproximadamente igual aos existentes nas células durante a diferenciação, se bem que só nestas nos tenha sido possível demonstrar a sua actividade de fosfátase ácida. Embora existam algumas gotículas lipídicas, não se observaram túbulos de parede lisa, ponto importante que focaremos mais tarde. A ausência de partículas de glicogénio contrasta com a sua abundância noutras glândulas sebáceas (Hibbs, 1962; Montagna, 1963 a, b; Henrikson, 1965; Bell, 1970). Tal facto poderá ser tomado como indicativo de menor participação da glicólise na energética das células da glândula prepucial, mas são necessários novos elementos para adequada interpretação fisiológica desta observação.

As células secretoras das glândulas sebáceas são sede de um processo contínuo de diferenciação e, por este motivo, torna-se difícil dividi-las em tipos estanques. Isto é particularmente notório nas da pele. Ellis e Henrikson (1963) e Ellis (1967), nas glândulas sebáceas cutâneas do homem, distinguiram apenas *células parcialmente diferenciadas,* com gotículas lipídicas pequenas e *células completamente diferenciadas,* em que as gotículas lipídicas atingiam grande número e diâmetro considerável mas não se notavam ainda sinais de desagregação celular. Nas da pele do rato, Brandes *et al.* (1965) descreveram *células em diferenciação* com vacuolização lipídica moderada, e *células maduras* com vacuolização muito acentuada. As nossas observações ultrastruturais nas glândulas sebáceas da pele do homem (Figs. 124 e 125) e do rato (Fig. 123) puseram-nos igualmente perante a dificuldade em classificar as células em transformação holócrina. Efectivamente, para além de um aumento crescente e progressivo do número e volume das gotículas lipídicas, que gradualmente restringem as áreas ocupadas pelo protoplasma, este, pouco se modifica mantendo a mesma organização onde predomina o retículo endoplásmico de cisternas dilatadas (Figs. 123-125). Nas glândulas prepuciais do rato foi-nos possível, no entanto, destrinçar três tipos celulares bem caracterizados que, curiosamente, ocupam situações bem definidas nas unidades secretoras.

As *células em início de diferenciação,* exclusivamente situadas nos ácinos glandulares, são ricas em ribosomas livres,

---

Fig. 123 — Glândula sebácea da pele do rato. No lado direito da figura distingue-se camada contínua de células basais (CB), achatadas, contendo núcleos alongados (N) e citoplasma com mitocôndrias arredondadas (mi) e grande número de ribosomas e polirribosomas livres (r). No lado oposto da figura, observa-se célula completamente diferenciada (C3), com núcleo estrelado (N) e citoplasma preenchido por gotículas lipídicas (L) separadas por estreitas faixas de hialoplasma com escassos organelos. Entre estes dois tipos celulares vêem-se células em diferenciação com gotículas lipídicas (L) de diverso tamanho, pequenos vacúolos claros correspondentes a cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso e liso (setas), mitocôndrias (mi) e pequenos corpos densos (CD). O contorno das células é sinuoso. Fixação: tetróxido de ósmio. Coloração: acetato de uranilo e citrato de chumbo. 9 000 ×


CB
L
L
CD
N
L
CD
L
C3
L
CD
L
N
mi
L
CD
L
CB
L
mi
TC
N
CB
LB

contêm cisternas disseminadas, por vezes dilatadas, de retículo endoplásmico rugoso e apresentam, pela primeira vez, agregados de túbulos de retículo endoplásmico liso intimamente associados a gotículas lipídicas de tamanho moderado; os grânulos perinucleares, de matriz predominantemente clara, situam-se na vizinhança imediata do aparelho de Golgi. *As células diferenciadas,* que se acumulam para dentro da desembocadura dos ácinos nos túbulos glandulares, caracterizam-se pela dilatação generalizada das cisternas do retículo endoplásmico rugoso, abundância de agregados de retículo endoplásmico liso junto das gotículas lipídicas e presença de grânulos perinucleares mais volumosos, de matriz predominantemente densa, frequentemente com inclusões cristalóides. Nas *células completamente diferenciadas,* que ocupam as porções média e proximal dos túbulos glandulares, avultam as gotículas lipídicas grandes e os grânulos perinucleares muito volumosos; os ribosomas livres são pouco numerosos, o retículo endoplásmico rugoso é menos desenvolvido e os dictiosomas do Golgi escassos.

Passando em revista as modificações que os organelos sofrem ao longo do processo de diferenciação, podem destacar-se algumas linhas evolutivas bem marcadas. Assim: A. O crescimento das gotículas lipídicas relaciona-se directamente com áreas circunscritas de retículo liso. B. Os grânulos perinucleares proteicos parecem desenvolver-se a partir de vesículas destacadas do complexo de Golgi. C. Há dilatação progressiva, mas transitória, do retículo endoplásmico rugoso acompanhada de um decréscimo contínuo dos ribosomas livres.

Analisemos, em pormenor, cada um destes aspectos.

A. As gotículas lipídicas das glândulas prepuciais aparecem já no hialoplasma das células basais sem relação com qualquer organelo. No início da diferenciação celular, o seu número e volume aumentam significativamente continuando, todavia, dispersas no citoplasma sem localização precisa. Surgem então túbulos de parede lisa nas imediações das gotículas lipídicas, por vezes rodeando-as completamente. Notemos porém, que

estas membranas de parede lisa não lhes formam uma membrana limitante própria. As gotículas lipídicas das glândulas prepuciais possuem uma orla linear osmiófila, semelhante à apontada por Fawcett (1966) nas células hepáticas, sem estrutura trilaminar.

No entanto, Palay (1958), nas glândulas de Meibomius do rato e Ellis e Henrikson (1963), nas glândulas sebáceas da pele humana, descreveram o aparecimento de gotículas lipídicas nas cisternas do aparelho de Golgi, aparentemente rodeadas de membrana que seria ulteriormente reforçada por outras membranas lisas do que resultaria como que uma carapaça (*husk*). Rogers (1957), nas glândulas sebáceas da pele do ratinho e Hibbs (1962), Ellis (1967) e Strauss e Matoltsy (1973), nas da pele humana, fizeram igualmente referência a gotículas ou vacúolos lipídicos limitados por membrana, se bem que nenhum destes investigadores tenha dado pormenores sobre a sua estrutura ou espessura. Do exame cuidadoso de glândulas sebáceas da pele humana e do rato, concluímos pela ausência de membrana limitante, provavelmente até aqui confundida com a linha osmiófila periférica, que nelas existe tal como na glândula prepucial, ou com membranas de parede lisa contíguas.

A existência de agregados de membranas lisas em íntimo contacto com as gotículas lipídicas, tinha já sido notada nas

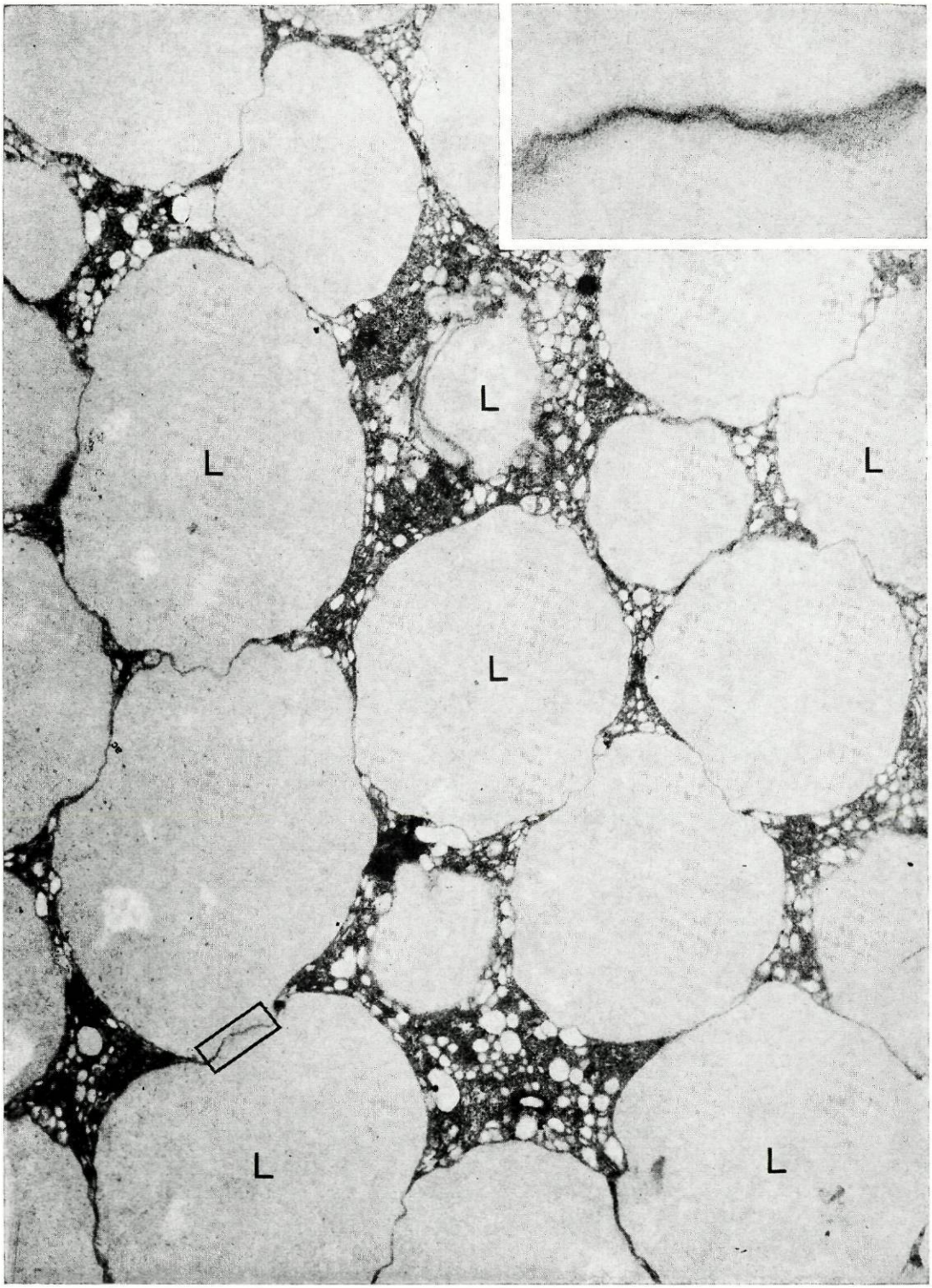
---

Fig. 124 — Células diferenciadas de glândula sebácea da pele humana. No citoplasma observam-se ribosomas livres disseminados (r), partículas de glicogénio agrupadas (setas longas e finas), mitocôndrias anfractuosas (mi), cisternas dilatadas de parede lisa (setas largas) e rugosa (setas curtas), corpos densos (CD), um aparelho de Golgi (Go) e gotículas lipídicas (L). No espaço intercelular (*) sinuoso, assinalam-se abundantes microvilosidades (setas pequenas). Fixação e coloração como na figura anterior. 24 000 ×

Fig. 125 — Célula completamente diferenciada de glândula sebácea da pele humana. As gotículas lipídicas (L) avultam deixando entre si pequenas áreas de hialoplasma com organelos do mesmo tipo, se bem que menos numerosos, do que os das células diferenciadas. Fixação e coloração como na figura 123. 11 200 ×

Fig. 126 — Glândula sebácea da pele humana. Na periferia de duas gotículas lipídicas justapostas observa-se rebordo osmiófilo sem estrutura trilaminar. Fixação e coloração como na figura 123. 90 000 ×


L
mi
mi
CD
Go
L
L



126

125

glândulas sebáceas cutâneas (Rogers, 1957; Hibbs, 1962; Ellis e Henrikson, 1963; Ellis, 1967; Bell, 1970, 1974 a, b; Strauss e Matoltsy, 1973) e nas prepuciais do rato (Dangelo e Munger, 1964) e do ratinho (Ozawa, 1967). Ellis e Henrikson (1963) e Ellis (1967), nas glândulas cutâneas humanas, averiguaram da mesma forma que nós nas prepuciais, que essa interrelação se acentuava à medida que a diferenciação progredia e as gotículas lipídicas aumentavam de volume. Parece-nos a este propósito significativa a nossa observação de um marcado aumento dos agregados de retículo liso após injecção de testosterona na fêmea e do seu decréscimo com a orquidectomia ou a injecção de estradiol no macho. No primeiro caso, registámos também, por vezes, gotículas lipídicas totalmente envoltas por túbulos lisos interconectados que se abriam aparentemente no seio do material gordo (Fig. 89).

Estes achados estão de acordo com a demonstração bioquímica, nesta glândula, da estimulação da incorporação de precursores radioactivos dos lípidos (acetato-2-^{14}C e mevalonato-2-^{14}C) em esteróis, após administração de testosterona, e sua inibição pela orquidectomia (Wilson, 1963). Tem sido, de resto, sugerida a participação do retículo endoplásmico liso na síntese de lípidos, nomeadamente de esteróides, nas células do córtex adrenal da cobaia (Sheridan e Belt, 1964), nas intersticiais do testículo do rato (Leeson, 1963; Tsai *et al.*, 1964) e da cobaia (Christensen, 1965) e nas células do corpo amarelo do ovário do porco (Cavazos *et al.*, 1969). Sabe-se que a fracção microssómica de células ricas em retículo endoplásmico liso contêm enzimas da síntese dos esteróides (Werbin e Chaikoff, 1961; Shikita *et al.*, 1964; Shikita e Tamaoki, 1965). Por outro lado, o retículo liso é o local de síntese das gorduras neutras nos enterócitos (Cardell *et al.*, 1967).

Este conjunto de factos sugere que, durante a diferenciação, o retículo liso interfira na síntese acelerada de triglicéridos e/ou esteróides e sua acumulação nas gotículas lipídicas.

B. Os grânulos perinucleares, pequenos e de matriz clara nas células em início de diferenciação, avolumam-se e adquirem matriz densa no decurso da maturação celular. Em ratos com menos de 3 semanas de idade, todos os grânulos apresentam matriz clara, o que coincide com um grau rudimentar de desenvolvimento das glândulas destes animais. Contudo, os grânulos claros continuam a formar-se, se bem que em menor número, nas células diferenciadas e nas completamente diferenciadas. Os grânulos mais pequenos localizam-se muito frequentemente entre as vesículas secretoras presentes numa das faces das pilhas de cisternas do complexo de Golgi. O conteúdo destas vesículas é constituído por material de densidade idêntica à da matriz dos grânulos claros. Além disso, observámos actividade de fosfátase ácida quer nas vesículas quer nos grânulos (Figs. 81-83). Estes achados são altamente sugestivos da origem golgiana dos grânulos perinucleares que, como veremos, se devem considerar verdadeiros lisosomas primários. Por outro lado, devemos sublinhar que não vimos imagens indicativas de formação de lípidos no aparelho de Golgi.

À medida que os grânulos perinucleares crescem, passam a conter cristalóides e a sua matriz pode tornar-se electrono-densa Assim teremos, sucessivamente, além dos grânulos de matriz clara sem cristalóides, nas células em início de diferenciação, grânulos do tipo A; grânulos do tipo B, com matriz clara e cristalóides; do tipo C, com matriz densa sem cristalóides; e do tipo D, com matriz densa e cristalóides. O facto de em cortes ultrafinos os cristalóides dos grânulos deste último tipo muitas vezes não se distinguirem, é devido a terem densidade idêntica à da matriz envolvente. Efectivamente, em cortes de parafina corados pela eosina ou pelo PAS e em cortes de congelação corados pelo método de Hayashi (1964), eles passam a destacar-se, incolores, no seio da matriz corada (Figs. 35, 37 e 78).

O aparecimento dos cristalóides e a densificação da matriz significam, como adiante veremos, aquisição de fosfolípidos por parte dos grânulos. Estes fenómenos não se apresentam nunca

associados ao aparelho de Golgi. É muito significativo que as hidrólases se mantenham circunscritas à matriz dos grânulos e não aos cristalóides. Em conclusão, apenas parecem ter origem golginana a membrana e a matriz dos grânulos perinucleares.

C. A dilatação das cisternas do retículo endoplásmico rugoso durante a diferenciação é sobretudo evidente em glândulas de ratos machos. Por outro lado, a injecção da testosterona acentuou-a nas células diferenciadas dos ratos fêmeas, enquanto a orquidectomia e a injecção do estradiol, nos ratos machos, produziram efeito contrário. Resultados paralelos aos nossos foram obtidos nos órgãos que constituem o complexo acessório genital do rato — lobos prostáticos, vesículas seminais e glândulas da coagulação — cujas unidades secretoras igualmente segregam grânulos proteicos. Nestas glândulas, Szirmai e van der Linde (1965), Helminen e Ericsson (1971), Dahl e Kjaerheim (1973) e Dahl e Tveter (1973), observaram atrofia do retículo endoplásmico rugoso após a orquidectomia, enquanto Gittinger e Lasnitzki (1972), Dahl *et al.* (1973) e Ichihara *et al.* (1973) referiram acentuação do seu desenvolvimento após a injecção da testosterona. Desta forma, parece legítimo concluir que a evolução do retículo endoplásmico rugoso depende, consideravelmente, da influência androgénica.

É, por outro lado, bem conhecida a responsabilidade deste organelo na síntese das proteínas destinadas à exportação (Caro e Palade, 1964; Nadler *et al.*, 1964; Droz, 1969) e das enzimas dos lisosomas (De Duve, 1963; De Duve e Wattiaux, 1966; Novikoff e Shin, 1964; Novikoff *et al.*, 1964) e dos peroxisomas (Novikoff e Shin, 1964; Essner, 1967). De acordo com o conceito clássico (Novikoff *et al.*, 1971), as hidrólases passam aos elementos golgianos na região do GERL. É por isso provável que a dilatação do retículo endoplásmico rugoso durante a diferenciação traduza a crescente actividade de síntese dessas enzimas destinadas a acumularem-se nos grânulos perinucleares em formação. A circunstância de muitos dos grânulos perinucleares

em crescimento, já sem qualquer relação espacial com o aparelho de Golgi, serem intimamente contíguos a cisternas dilatadas do retículo endoplásmico rugoso, sugere que possam, em alguns casos, receber directamente proteínas enzimáticas recém-sintetizadas sem passagem pelo aparelho de Golgi.

O elevado número de ribosomas e de polirribosomas livres nas células basais e nas células em início de diferenciação das glândulas prepuciais do rato relaciona-se, provavelmente, com a síntese de proteínas inerentes ao crescimento celular (Novikoff e Holtzman, 1970). O decréscimo do número dos ribosomas livres na fase terminal da diferenciação sebácea é facto há muito conhecido (Montagna, 1956; Hibbs, 1962). Juntamente com a atrofia do retículo endoplásmico rugoso constitui, certamente, uma indicação da diminuição da actividade de síntese proteica, tal como sucede no eritroblasto policromatófilo quando a actividade da síntese de hemoglobina declina (Bessis, 1972). Assim, o fenómeno pode encarar-se como uma manifestação incipiente da maturação involutiva destas células.

Admite-se que a actividade funcional do nucléolo e a sua estrutura morfológica sejam interdependentes, isto é, que a variações estruturais correspondam modificações no esquema de síntese dos ácidos nucleicos (Fawcett, 1966; Busch e Smetana, 1970). Karásek *et al.* (1973) verificaram predomínio de nucléolos com nucleolonemas nas células pouco diferenciadas das glândulas sebáceas da pele humana e a presença, nas completamente diferenciadas, de 68 p. 100 de nucléolos em forma de anel, de 24 p. 100 de nucléolos compactos e, apenas, de 8 p. 100 de nucléolos com nucleolonemas. Nas glândulas prepuciais do rato observámos fenómeno em parte paralelo, isto é, predomínio de nucléolos com nucleolonemas nas células em diferenciação e aparecimento de formas compactas e em anel nas células em desagregação holócrina.

Para Busch e Smetana (1970) e para Terao *et al.* (1971), os nucléolos com nucleolonemas denotam grande actividade de síntese de ARN, enquanto as formas em anel e compactas traduziriam paragem na produção ou produção menos activa.

Nesta conformidade, parece lógico pensar que as variações morfológicas nucleolares observadas traduzam síntese activa de ARN durante a diferenciação e a sua quebra no fim desta. A diminuição dos ribosomas poderá, naturalmente, ser uma consequência deste fenómeno. No entanto, devemos notar que enquanto as células completamente diferenciadas têm já menos ergastoplasma do que as diferenciadas, continuam a apresentar nucleolonemas.

INVOLUÇÃO CELULAR — A DESAGREGAÇÃO HOLÓCRINA

Como já referimos na introdução deste trabalho, são pouco conhecidos os fenómenos subcelulares que acompanham a desagregação holócrina. Certas observações ultrastruturais revelaram que as mitocôndrias persistem íntegras até fases adiantadas da involução das células sebáceas (Charles, 1960; Ellis, 1967). Recentemente, Brandes *et al.* (1965) e Rowden (1968) responsabilizaram os lisosomas pela destruição celular respectivamente nas glândulas sebáceas da pele do rato e do ratinho. Notaram o aparecimento, nas células em diferenciação, de corpos densos contendo hidrólases que, no momento da desintegração, sofriam aparente rotura da membrana com derramamento de fosfátase ácida (Brandes *et al.*, 1965) e de aril sulfátase (Rowden, 1968) no hialoplasma.

No decurso do presente trabalho tivemos oportunidade de estudar, em pormenor, a estrutura fina deste estádio da involução celular, registando aspectos que podem ajudar a esclarecer os mecanismos da desagregação sebácea. Trata-se de um processo progressivo que, no núcleo, se traduz pela fragmentação da membrana perinuclear e pela degradação de todo o material cromatínico e nucleolar transformado numa massa homogénea de finas partículas. No citoplasma, surgem numerosos corpos autofágicos que tentámos sistematizar em 4 tipos.

O tipo 1 contém cisternas alteradas do retículo endoplásmico rugoso e ribosomas livres; o tipo 2 membranas mas não

ribosomas numa matriz densa e o tipo 3 restos protoplasmáticos heterogéneos; são todos três pequenos e rodeados por membrana. O quarto tipo é de maiores dimensões e conteúdo também heterogéneo, mas o contorno é constituído por múltiplas membranas justapostas lembrando figuras mielínicas.

A filiação dos corpos autofágicos do tipo 1 nas cisternas do retículo endoplásmico rugoso é por demais evidente através do exame de formas intermédias (Fig. 91). Vê-se, assim, que o seu modo de formação consiste numa invaginação da membrana da cisterna. Os outros tipos exibem continuidades da membrana com membranas quer do retículo endoplásmico quer do Golgi. Este é sobretudo o caso dos corpos de tipo 4, cujas membranas estratificadas muitas vezes parecem resultar de mútiplas extensões das cisternas do aparelho de Golgi (Fig. 27).

Embora seja pouco clara a relação entre os vários tipos, não pode haver dúvidas de que em todos eles se está perante fenómenos de segregação e degradação focal de organelos, do género dos existentes nas glândulas mamárias em involução (Helminen e Ericsson, 1968 a, b), na próstata, vesícula seminal e glândula da coagulação após castração e incubação em meio não suplementado (Gittinger e Lasnitzki, 1972; Dahl e Kjaerheim, 1973; Dahl e Tveter, 1973), nas células hepáticas durante o jejum e nas células pancreáticas após a administração de substâncias tóxicas como a β-3-tienilalanina, a azaserina e o triparanol (Swift e Hruban, 1964).

De forma idêntica ao que acontece nessas situações, alguns corpos autofágicos contêm fosfátase ácida. No entanto, esta actividade enzimática não se revelou abundante, limitando-se aos corpos do tipo 4. A fosfátase ácida neles existente não parece provir dos grânulos perinucleares dado que nunca surpreendemos imagens de coalescência entre estas formações. Observámos, no entanto, alguns pequenos corpos densos, na imediata vizinhança de corpos autofágicos do tipo 4, o que faz supor que as respectivas membranas possam fundir-se. De um modo geral, porém, devemos repetir que a escassez de hidrólases nas células em desagregação sugere participação pouco intensa

destas enzimas nos fenómenos degradativos. Nomeadamente nunca vimos fostátase ácida livre no citoplasma. O facto de os corpos autofágicos serem descarregados intactos no sebo, juntamente com os grânulos perinucleares que então se rompem derramando as hidrólases da matriz, permite pelo contrário supor que é neste estádio que o conteúdo dos corpos autofágicos sofra uma acentuação da sua digestão enzimática.

A persistência de mitocôndrias inalteradas durante o processo da desagregação sebácea, assinalada também nas glândulas sebáceas da pele humana (Charles, 1960; Ellis, 1967), sugere, por outro lado, que o metabolismo oxidativo nestas glândulas se prolongue no decurso da involução celular.

Neste momento desejamos realçar outro dos contributos morfológicos do nosso trabalho, o qual consistiu na observação de que, após a rotura da membrana dos grânulos perinucleares, os cristalóides intragranulares, livres na secreção, acabam por agregar-se originando as grandes massas cristalóides do sebo. Estas formações, descritas pela primeira vez por Schaffer (1933), confundidas por Pannese (1954) com células córneas do epitélio de revestimento dos canais excretores e consideradas como resultantes da transformação dos grânulos de secreção (Schaffer, 1933; Beaver, 1960, 1963; Brown e Williams, 1972), representam, efectivamente, agrupamentos de cristalóides inicialmente livres (Figs. 29 e 30). Muitas imagens (Fig. 33) sugerem que os cristalóides justapostos acabam por fundir-se ao nível das suas faces.

SECREÇÃO LIPÍDICA

Citoquímica

A positividade das gotículas lipídicas das células secretoras e do sebo, ao Negro de Sudão B e ao *Oil red O,* pode ser devida a triglicéridos, colestéridos ou ácidos gordos em fase líquida (Pearse, 1960). A coloração rósea pelo sulfato do azul do Nilo confirmou em parte esta suposição (Adams, 1965), mas

a ausência de coloração pelo azul do Nilo propriamente dito, corante básico que tinge os corpos de reacção ácida, lipídicos ou não, torna improvável a presença, nas gotículas lipídicas, de ácidos gordos livres, de fosfoglicéridos, sulfátidos (Adams, 1965), glicolípidos ou lipopigmentos (Ganter e Jollès, 1969). A cor azul do citoplasma das células acinosas e do sebo, interpretámo-la como resultado da reacção auxocrómica do azul do Nilo propriamente dito com os componentes basófilos das células e da secreção. Não confirmámos os achados de Pannese (1954), de Beaver (1960) e de Marois e Salesses (1967), segundo os quais haveria, com este método, coloração azul das gotículas lipídicas.

A negatividade das gotículas lipídicas ao método de Holczinger confirmou a ausência de ácidos gordos livres, saturados ou não (Ganter e Jollès, 1969), ao passo que a coloração negra pelo método do ácido ósmico-α-naftilamina (OTAN) de Adams (1961) sugeriu redução do tetróxido de ósmio por lípidos hidrófobos insaturados. O estudo citoquímico ultrastrutural reforçou esta conclusão, dado que as gotículas se mostraram osmiófilas e esta osmiofilia desaparecia após oxidação. A extracção pela acetona indicou presença de ésteres lipídicos simples (Ganter e Jollès, 1969).

Por outro lado, embora o Negro de Sudão B core os fosfolípidos (Lison, 1960), a negatividade das gotículas lipídicas ao teste de Baker e a sua não-coloração pelo acetato de uranilo em microscopia electrónica permitiram excluir estas substâncias. Efectivamente, não só o método da hemateína ácida de Baker é considerado específico dos fosfolípidos (Pearse, 1960; Adams, 1965) como é igualmente conhecida a afinidade dos iões uranilo para os seus grupos fosfato (Passow *et al.*, 1961; Barton, 1968).

Em conclusão, as gotículas lipídicas conteriam apenas ésteres lipídicos simples que tanto podem ser triglicéridos como colestéridos. Os resultados negativos da reacção de Schultz e do método do ácido perclórico-naftoquinona (PAN) de Adams (1961), revelaram, porém, ausência de colesterol e dos seus ésteres e levam-nos a concluir que as gotículas lipídicas das

glândulas prepuciais do rato apenas parecem conter triglicéridos.

É todavia de referir que a análise bioquímica de macerados de glândulas prepuciais do rato revelou a presença de colesterol (Nicolaides, 1965; Freinkel e Aadalen, 1964; Nicolaides *et al.*, 1968) e diidrosterol (Ward e Moore, 1953). Por outro lado, Montagna e Noback (1946), Pannese (1954) e Brown e Williams (1972), observaram positividade de certas reacções específicas do colesterol e dos colestéridos (as reacções de Liebermann e Burchardt, da digitonina e do método do ácido perclórico-naftoquinona de Adams), no sebo desta glândula, mas não nos ácinos. Para Montagna e Noback (1946) e para Pannese (1954), o colesterol e os colestéridos seriam sintetizados no lume dos canais excretores dado que observaram acentuação da birrefringência da secreção em direcção à porção proximal do canal excretor principal e notaram o fenómeno da cruz de Malta na secreção. No nosso material, não obtivemos provas citoquímicas da existência de colesterol ou seus ésteres no sebo. É possível que a baixa concentração local dessas substâncias seja responsável pela negatividade deste resultado.

A presença de triglicéridos nas gotículas lipídicas contraria a opinião de Nicolaides (1965) segundo a qual a elevada percentagem dessas substâncias encontrada bioquimicamente em macerados e na secreção da glândula prepucial (Freinkel e Aadalen, 1964; Nicolaides, 1965; Helmy e Hack, 1967; Nicolaides *et al.*, 1968) se deveria a contaminação pelo tecido adiposo subcutâneo. É interessante relembrar que a secreção das glândulas sebáceas cutâneas do homem é também muito rica em triglicéridos (Nicolaides e Foster, 1956; Haahti, 1961; Nicolaides *et al.*, 1968; Downing *et al.*, 1969). Em contrapartida, estes lípidos são muito escassos nas glândulas cutâneas do rato, onde predominam os dicéridos dos tipos I e II (Nicolaides, 1965; Nikkari, 1965).

Estas diferenças talvez se devam à circunstância de os componentes gordos do sebo das glândulas prepuciais terem certas funções específicas. Além de actuarem como lubrificantes

das mucosas genitais durante o coito (Beaver, 1960) contêm feromonas (Karlson e Butenandt, 1959; Stanley e Powell, 1941; Parkes e Bruce, 1961; Orsulak e Gawienowski, 1972), ou seja lípidos aromáticos (Mykytowycz e Goodrich, 1974) que funcionam como agentes de comunicação olfactiva entre animais da mesma espécie.

Efeitos hormonais

O peso e o volume têm sido considerados índices da actividade lipogénica das glândulas sebáceas da pele humana (Rony e Zakon, 1943; Strauss e Kligman, 1961; Strauss *et al.*, 1962), do rato (Haskin *et al.*, 1953; Lasher *et al.*, 1954; Lorincz e Lancaster, 1957; Ebling, 1961, 1963; Lorincz, 1963), das supracaudais da cobaia (Martan, 1962; Martan e Price, 1967) e das prepuciais do ratinho (Burdick e Gamon, 1941) e do rato (Korenchevsky e Dennison, 1934 a, b, 1935, 1936 a, b; Noble e Collip, 1941 a, b; Huggins *et al.*, 1955; Lorincz e Lancaster, 1957; Beaver, 1960; Freinkel, 1963; Lorincz, 1963; Burgess e Wilson, 1963; Freeman *et al.*, 1964; Freinkel e Aadalen, 1964; Ebling *et al.*, 1969, 1970 a, b, 1971). Este critério afigura-se-nos, no entanto, dificilmente aplicável às glândulas prepuciais do rato. Trata-se de glândulas que segregam não só gotículas lipídicas, mas também numerosos e volumosos grânulos proteicos, os quais interferem necessariamente no peso e no volume glandulares. Por outro lado, estes dependem também da vasta rede de canais excretores e do sebo neles contido e não apenas das condições dos túbulo-ácinos glandulares. Concluímos, por estes motivos, que para o estudo da influência hormonal na lipogénese seria mais aconselhável utilizar a medida do diâmetro das gotículas lipídicas em áreas bem definidas, isto é, nas células completamente diferenciadas da porção proximal dos túbulos glandulares onde são mais volumosas.

O facto de termos utilizado ratos com oito semanas de vida merece um comentário. Efectivamente, não só as glândulas prepuciais estão já então completamente desenvolvidas, mas

também se trata de um período correspondente à adolescência, durante o qual as glândulas sebáceas são particularmente sensíveis à acção hormonal (Strauss *et al.*, 1962; Lorincz, 1963). As doses de testosterona (1 mg subcutâneo diário, durante 5 dias) e de estradiol (16,5 μg subcutâneos diários, durante 10 dias) que injectámos obedeceram, também, a indicações precisas. Enquanto Ando *et al.* (1962) demonstraram que 1 mg diário de propionato de testosterona era suficiente para restabelecer o funcionamento normal das glândulas sebáceas em ratos orquidectomizados, Beaver (1960) verificou que a injecção continuada de 16,5 μg de benzoato de estradiol em ratos machos provocava hipoplasia testicular.

Os resultados que obtivemos mostraram que a injecção da testosterona nas fêmeas fez aumentar o diâmetro das gotículas lipídicas até atingirem dimensões idênticas às encontradas nos ratos machos normais (Quadro 1). Por outro lado, a orquidectomia e a injecção de estradiol nos ratos machos induziram um decréscimo da ordem dos 10 e 20 p. 100, respectivamente, no diâmetro das gotículas lipídicas, as quais passaram a ter diâmetro médio inferior ao das gotículas presentes nas fêmeas normais (Quadro 1). Estes achados contestam as conclusões de Korenchevsky e Dennison (1934 a, b; 1935, 1936 a, b) segundo as quais as glânduulas prepuciais do rato não respondem aos estrogénios. Salientamos, a propósito, que os métodos de avaliação utilizados por estes autores se basearam no estudo das variações do peso e da citoarquitectura glandulares os quais, como vimos, nos parecem menos válidos no caso desta glândula.

Desejamos salientar novamente que nos machos normais e nas fêmeas tratadas com testosterona, eram numerosos e volumosos os agregados circunscritos de túbulos de parede lisa, enquanto nos ratos orquidectomizados ou injectados com estradiol, o retículo liso era sensivelmente menos desenvolvido. Nas glândulas sebáceas costovertebrais do criceto e nas da pele do *Galago crassicaudatus,* Bell (1974 b) descreveu áreas mais extensas de retículo liso nos machos e fêmeas castrados do que nos animais normais. Como tentativa para explicar o achado

simultâneo, nos primeiros, de gotículas lipídicas pequenas e de áreas grandes de retículo liso, Bell (1974 b) sugeriu que houvesse armazenamento, nos túbulos lisos, de precursores dos lípidos que não puderam ser incorporados nas gotículas lipídicas.

Finalmente, registámos hipoplasia glandular mais acentuada nos ratos orquidectomizados do que nos ratos injectados com estradiol. O facto pode talvez atribuir-se à circunstância de, nos primeiros, a depleção androgénica testicular motivar marcada diminuição na produção das mitoses (Ebling, 1954, 1957 a, b) com inerente diminuição do volume do parênquima secretor. Em contrapartida, Ebling (1974) referiu que os estrogénios não afectam a incidência das mitoses nas glândulas prepuciais do rato.

As alterações que observámos, a nível ultrastrutural, no tocante às variações da electrono-opacidade do conteúdo das gotículas lipídicas das células secretoras após a orquidectomia e as injecções da testosterona e do estradiol, parecem reflectir variações na respectiva composição química. A testosterona provocaria aumento da formação de lípidos com menor resistência à acção dos solventes durante a desidratação e a inclusão em Epon. O escaleno, que é um óleo, estaria neste caso. A orquidectomia e o estradiol determinariam síntese de substâncias gordas com menor grau de saturação, mais osmiófilas, as quais seriam melhor preservadas durante as manipulações da técnica citológica. O estudo cromatográfico da síntese lipídica das glândulas prepuciais do rato após a acção da testosterona e da castração demonstrou, efectivamente, que a testosterona estimula a produção de escaleno enquanto a orquidectomia a inibe (Sansone, 1968).

SECREÇÃO PROTEICA

Citoquímica

A positividade da matriz e dos cristalóides dos grânulos perinucleares à reacção do tetrazónio acoplado de Danielli e a digestão do seu conteúdo pela prónase indicam a presença de materiais proteicos em ambos os componentes estruturais dos grânulos. A reacção de Danielli é considerada específica das proteínas em geral (Pearse, 1960) dado que os sais de diazónio reagem com uma grande variedade de ácidos aminados (Howard e Wild, 1957). A prónase extrai todos os tipos de proteínas (Monneron, 1966); o efeito obtido no nosso material revelou um apreciável grau de especificidade desta digestão enzimática, em relação aos grânulos, dada a simultânea preservação dos ribosomas e das gotículas lipídicas. A digestão apenas foi concludente quanto à matriz já que a oxidação prévia para remoção do ósmio (Monneron e Bernhard, 1966), desvanecia os cristalóides.

Nenhuma destas provas fornece dados sobre a natureza das proteínas dos grânulos. No entanto, a positividade à reacção do DDD da totalidade do conteúdo dos grânulos após tratamento dos cortes pelo ácido tioglicólico e a afinidade da matriz e dos cristalóides para o citrato de chumbo, sugerem a existência de ácidos aminados contendo grupos sulfidrilo (Passow *et al.*, 1961; Pearse, 1960). Algumas observações da literatura reforçam este ponto de vista. Beaver (1960) admitiu a possibilidade de os grânulos conterem tirosina e, talvez, fenilalanina e histidina, pelo facto de se tingirem pelo Negro rápido K e de corarem fracamente com as reacções xantoproteica e de Millon e fortemente pela reacção de Morel-Sisely. Finalmente, a coloração dos grânulos pelo escarlate de Biebrich e pela eosina B, sobretudo a pH 4,95 (Beaver, 1960) e a positividade ao teste «solochrom cyanin» (forma ácida) (Brown e Williams, 1972) sugeriram a existência de proteínas básicas.

A positividade da matriz dos grânulos claros e dos densos ao PAS e da matriz dos grânulos claros ao ácido periódico/metenamina-prata levou-nos a concluir pela presença de glicoproteínas apenas na matriz. A negatividade da reacção do ferro coloidal de Hale, específica dos mucopolissacáridos ácidos (Pearse, 1960), permitiu excluir estas substâncias.

A osmiofilia e a uranofilia quer da matriz densa, quer dos cristalóides, parecem dever-se à presença de fosfolípidos. Sabe-se que o tetróxido de ósmio é capaz de formar compostos com a lecitina e outros fosfátidos, quer reagindo com as duplas ligações dos ácidos gordos, quer combinando-se com grupos polares sob a forma de intermediários reduzidos (Riemersma e Booij, 1962; Riemersma, 1963; Korn, 1967). Por outro lado, os iões uranilo apresentam grande afinidade para os grupos fosfato dos fosfolípidos (Passow *et al.*, 1961; Barton, 1968). Além disso, estas estruturas mostraram-se positivas, no microscópio de luz, ao método da hemateína ácida de Baker e coraram de vermelho com o método do OTAN de Adams (1961). Com o teste de Baker, os cristalóides tomaram a coloração azul escuro típica (Pearse, 1960; Adams, 1965), enquanto os grânulos das células diferenciadas, correspondentes pelo seu tamanho e distribuição aos grânulos densos da microscopia electrónica, coraram uniformemente de preto. Não sendo esta cor tão típica dos fosfolípidos como a cor azul (Adams *et al.*, 1965), considera-se, porém, indicativa de positividade neste teste (Pearse, 1960; Adams, 1965).

A presença de fosfolípidos poderá justificar a positividade inespecífica dos cristalóides à metenamina-prata em peças fixadas pelo glutaraldeído. Efectivamente, as soluções comerciais de glutaraldeído estão habitualmente contaminadas pela acroleína (Fahimi e Drochmans, 1965), a qual, reagindo com os ácidos gordos insaturados frequentemente encontrados nos fosfolípidos, pode levar à formação de grupos aldeído (Jones, 1972) capazes de se combinarem com os sais de prata (Rambourg 1967).

Em conclusão, os nossos achados mostraram que, nos grânulos perinucleares, a matriz clara contém glicoproteínas, a

matriz densa glicoproteínas e fosfolípidos e os cristalóides proteínas e fosfolípidos. A possibilidade de as proteínas estarem complexadas com os fosfolípidos nos cristalóides e nos grânulos densos explicaria a falta de sudanofilia dos fosfolípidos nestas estruturas (Lison, 1960).

Enzimas

Tendo Hayashi (1964, 1967) demonstrado actividade de fosfátase ácida e de β-glucuronídase nos grânulos perinucleares, foi-nos, contudo, possível esclarecer que estas hidrólases se localizam exclusivamente na matriz. Dado que a β-glucuronídase é uma glicoproteína (Fishman e Ide, 1967), admitimos que possa ser a responsável pela positividade ao PAS e ao ácido periódico/metenamina-prata, tanto mais que a N-acetil-β-glucosaminídase, outra glicosídase de natureza glicoproteica (Robinson e Stirling, 1968), não foi identificada por nós e outros (Pugh e Walker, 1961; Hayashi, 1967) nos grânulos.

Embora já aflorados alguns problemas referentes à origem e ao papel dos lisosomas nas células secretoras das glândulas holócrinas, é agora o momento de os encarar numa visão global.

Parece denominador comum às várias glândulas sebáceas cutâneas, até agora estudadas ultrastruturalmente, o aumento do número de lisosomas em paralelo com o processo de diferenciação (Brandes *et al.*, 1965; Rowden, 1968; Bell, 1971). Trata-se de corpos geralmente de pequenas dimensões, rodeados de membrana, de matriz uniformemente electrono-densa, como é habitual nos vulgares corpos densos (Novikoff, 1961), mas contendo inclusões cristalinas nos primatas subhumanos (Bell, 1971). Dotados de fosfátase ácida , estérases e aril-sulfátase, tais corpos densos parecem originar-se em vesículas do Golgi que apresentam também fosfátase ácida e estérases (Brandes *et al.*, 1965; Bell, 1971), mas não aril-sulfátase (Rowden, 1968). O seu rompimento nas células maduras derramaria as hidrólases no citoplasma, onde não foram descritos corpos autofágicos.

Os lisosomas primários que encontrámos nas glândulas prepuciais diferem, em muitos aspectos, deste esquema. Por um lado, há-os de dois géneros: os pequenos corpos densos e os grânulos perinucleares. Os primeiros compartilham nas dimensões, estrutura fina, vizinhança da zona do Golgi e actividade de fosfátase ácida, muitos dos caracteres dos corpos densos das glândulas sebáceas cutâneas. Contudo, o aumento do seu número não é muito marcado ao longo da diferenciação, se bem que pareçam ser as mais prováveis fontes de hidroláses para os corpos autofágicos de tipo 4. Os segundos, os grânulos perinucleares, têm fosfátase ácida mas não aril-sulfátase e possuem grande quantidade de β-glucuronídase. Pelo seu número, tamanho e riqueza em hidrólases, têm aparentemente muito maior importância do que os corpos densos e a sua intervenção na autólise é, como vimos, *sui generis*. Finalmente, a sua origem na região do GERL é sugerida por numerosas imagens, e contêm cristalóides que lembram os cristais dos corpos densos de alguns primatas subhumanos (Bell, 1971) mas, ao contrário destes, não possuem hidrólases nem estriação.

O que torna estes lisosomas únicos é sobretudo o seu papel funcional. Não se rompem no interior do citoplasma como foi sugerido para as glândulas da pele, nem a sua matriz é exteriorisada por exocitose como nos grânulos de secreção das células epiteliais do lobo ventral da próstata do rato (Helminen e Ericsson, 1970) ou nos citosomas do tipo II das células alveolares do pulmão do coelho (Goldfischer *et al.*, 1968). Assemelham-se antes às vesículas do tipo I da matriz das cartilagens de conjugação da cobaia (Thyberg e Friberg, 1970), que são expulsas, intactas, das células. Os grânulos perinucleares, uma vez libertados, desintegram-se e só então as suas hidrólases, difusamente distribuídas no sebo, parecem digerir os corpos autofágicos e o que resta do citoplasma das células.

É ainda possível que a enorme quantidade de β-glucuronídase (Beyler e Szego, 1951; Levvy *et al.*, 1958; Wakabayashi *et al.*, 1966; Sherins e Bardin, 1971) libertada no meato prepucial possa actuar, juntamente com a α-manosídase, a β-galacto-

sídase, a N-acetil-β-glucosaminídase e a β-glucuronídase existentes no sémen e nas secreções útero-vaginais do rato (Conchie e Findlay, 1959; Conchie *et al.*, 1959), na hidrólase dos mucopolissacáridos das proteínas urinárias (Anderson e Mclagan, 1955), do ovomucoide (Gottschalk e Ada, 1956), do muco cervical (Bergman e Werner, 1951; Shettles *et al.*, 1951) e do acrosoma dos espermatozóides (Clermont *et al.*, 1955).

Efeitos hormonais

Nas células completamente diferenciadas da porção proximal dos túbulos glandulares, não observámos diferenças significativas no diâmetro médio dos grânulos perinucleares entre os dois sexos. A orquidectomia e a injecção de estradiol nos machos e a injecção de testosterona nas fêmeas, não provocaram alterações significativas dos valores normais. Apenas a orquidectomia determinou diminuição franca dos diâmetros que se tornaram menores do que os das fêmeas normais e do que os dos ratos machos injectados com estradiol. Em contrapartida, registámos, no mesmo local, variações marcadas na concentração dos grânulos por unidade de superfície. A concentração era mais elevada nos machos do que nas fêmeas normais, diminuiu nos machos com a injecção de estradiol e aumentou significativamente nas fêmeas com a administração de testosterona. Finalmente, a administração de estradiol nos machos tornou a concentração de grânulos por unidade de superfície idêntica à das fêmeas normais. O número de grânulos parece, assim, directamente proporcional ao teor de hormona sexual masculina e inversamente proporcional ao de hormona feminina.

Conhecida a presença de β-glucuronídase na matriz dos grânulos perinucleares e a sensibilidade desta enzima à influência das hormonas sexuais (Fishman e Fishman, 1944; Beyler e Szego, 1951, 1954 a, b; Conchie e Findlay, 1959; Conchie *et al.*, 1959; Patterson *et al.*, 1964; Sherins e Bardin, 1971), é de crer que a variação do número ou concentração dos grânulos reflicta as modificações quantitativas do teor global desta enzima nas

glândulas, uma vez que não houve variação na intensidade da coloração citoquímica de cada grânulo. Efectivamente, Sherins e Bardin (1971) encontraram, por meios bioquímicos, maior actividade β-glucuronidásica nas glândulas dos ratos machos do que nas das fêmeas, actividade que se intensificava nestas e em machos castrados com a administração de testosterona (Patterson *et al.*, 1964; Sherins e Bardin, 1971). A injecção dos anabolizantes, noretrandolona e androstanazole, a machos orquidectomizados, produziu efeito idêntico ao da testosterona (Patterson *et al.*, 1964).

Devemos ainda frizar que os grânulos perinucleares contêm, além de enzimas, fosfolípidos e proteínas porventura não enzimáticas. Assim, as variações globais do diâmetro e do número dos grânulos podem implicar também uma acção hormonal sobre tais substâncias.

Szego *et al.* (1971) e Szego e Seeler (1973) referiram que a injecção de testosterona, do estradiol e do dietiletilbestrol em ratos ovariectomizados provocava, nas glândulas prepuciais, migração dos grânulos de secreção em direcção ao núcleo das células e labilização da membrana dos grânulos com libertação precoce das enzimas hidrolíticas que contêm. Porém, nas nossas preparações de microscopia óptica e ultrastrutural não observámos, após a estimulação hormonal, variação evidente na localização dos grânulos perinucleares nem destruição prematura dos grânulos.

CANAIS EXCRETORES. SEU PAPEL NA FORMAÇÃO DO SEBO

Os canais excretores não parecem ter apenas uma função veículadora do sebo para o exterior. Ao longo deles, observámos abundante descamação de células que contêm diversos tipos de grânulos aparentemente secretórios. Outras sofrem queratinização e vão igualmente fazer parte do sebo.

Na porção estratificada dos canais excretores secundários, as células suprajacentes às células basais contêm pequenos

corpos densos e corpos de conteúdo microvesicular ou multigranuloso, muito semelhantes aos corpos vesiculares da epiderme da tartaruga e aos corpos multigranulosos da epiderme da galinha recentemente descritos por Matoltsy e Huszar (1972). Lembram ainda, pelo elevado número e pela situação, os *membrane coating granules* (MCG) (Matoltsy e Parakkal, 1965) das células espinhosas da epiderme humana. Por outro lado, Hashimoto *et al.* (1966) e Hayward e Hackemann (1973) observaram grânulos do mesmo tipo em epitélios não queratinizados de algumas mucosas orais, que denominaram MCG a despeito de não terem estrutura lamelar. Os grânulos muito opacos referidos, nesta glândula, por Dangelo e Munger (1964) parecem corresponder-lhes se bem que, no nosso material, o conteúdo fosse variável e não uniformemente denso.

Outros grânulos, menos numerosos e mais volumosos do que os anteriores, com matriz caracteristicamente interrompida por espaços claros, têm actividade de fosfátase ácida e de β-glucuronídase, pelo que devem considerar-se lisosomas (De Duve, 1963). Do ponto de vista citoquímico, a positividade da matriz ao teste de Baker, confere-lhe certa analogia com a matriz densa dos grânulos perinucleares que contêm fosfolípidos. Embora não pareçam sofrer exocitose, a natureza do conteúdo destes grânulos permite supor que possam desempenhar, no lume dos canais excretores, função idêntica à dos grânulos perinucleares após rotura das células descamadas, intervindo na digestão dos restos celulares contidos no sebo.

As células superficiais do epitélio dos canais excretores secundários de maior calibre, são idênticas às celulas córneas da epiderme (Brody, 1970) e de outros epitélios (Matoltsy e Parakkal, 1967; Bauer, 1972; Lyne e Hollis, 1972; Matoltsy e Huszar, 1972), já que dotadas de banda marginal e cheias de material amorfo-filamentoso, mas não são precedidas de células granulosas com queratohialina. Este tipo de queratinização ocorre nas unhas, cornos, penas e garras, e foi desde há muito denominado «queratinização dura» (Giroud e Leblond, 1951; Roth, 1967; Ham, 1969). Segundo Matoltsy

(1962), tal queratina seria mais rica em enxofre do que a «queratina mole» do revestimento epidérmico. Recentemente, descreveu-se a presença de células queratinizadas na epiderme dos quelónios (Matoltsy e Huszar, 1972) e dos anfíbios (Parakkal e Matoltsy, 1964; Farquhar e Palade, 1965; Lavker, 1971, 1972) sem a existência prévia de grânulos de queratohialina. A curiosidade da nossa observação consiste em termos encontrado, num epitélio malphigiano de um mamífero, um exemplo deste facto.

No epitélio do canal excretor principal surgem, pelo contrário, as assentadas de células características da epiderme e a habitual queratinização mole, mas com certos pormenores que merecem um comentário.

As células da camada espinhosa contêm típicos *membrane coating granules* (MCG), de estrutura lamelar, com actividade de fosfátase ácida, os quais oferecem frequentes imagens de exocitose nas células granulosas mais superficiais. Nas células granulosas profundas, notámos dois tipos de grânulos de queratohialina. Uns, pequenos e arredondados, sem tonofibrilas aderentes, lembram os pequenos grânulos de queratohialina da epiderme humana (Matoltsy e Parakkal, 1967) e do rato (Bell e Kellum, 1967; Bonneville, 1968) e os grânulos «esféricos» da almofada plantar do ratinho e do focinho do cão (Suzuki *et al.*, 1973). Outros, maiores, associados a feixes de tonofilamentos, são em tudo semelhantes aos grânulos típicos da epiderme humana (Odland e Reed, 1967; Suzuki e Kurosumi, 1972), da do rato (Bauer, 1972) e das mucosas queratinizadas (Farbman, 1966; Squier, 1973; Hayward, 1973; Hayward e Hackemann, 1973). Finalmente, nas células mais superficiais, observámos grânulos de queratohialina, geralmente grandes, com pequenos grânulos esféricos como que incrustados à periferia. Trata-se de formações semelhantes aos grânulos «compostos» descritos por Jessen (1970) no epitélio malphigiano da língua do rato.

Jessen (1970, 1973) viu os pequenos grânulos periféricos («grânulos simples»), quer agregados nos grânulos «com-

postos», quer livres, e atribuiu-lhes a formação da banda marginal das células córneas dado o aspecto idêntico destas estruturas após a dupla fixação ou a fixação única pelo glutaraldeído, a sua acentuada osmiofilia e a riqueza em radicais sulfidrilo. No nosso material, confirmámos que tanto a banda marginal como os grânulos de queratohialina «simples» são oxidáveis mas que a descoloração, após oxidação pelo ácido periódico, é mais rápida no caso dos grânulos «simples». Por outro lado, o facto de termos observado na superfície dos maiores canais excretores secundários grande número de células com banda marginal na ausência de grânulos de queratohialina, leva-nos a pensar que aqueles grânulos não contribuem necessariamente para a génese da banda marginal.

Neste estudo confirmámos a digestibilidade dos grânulos da queratohialina pelas proteases (Jessen, 1970; Ugel, 1971; Wolff e Schreiner, 1971). A matriz dos três tipos de grânulos foi completamente digerida por um soluto aquoso de prónase a 0,5 p. 100 actuando durante 15 minutos em cortes duplamente fixados e oxidados. Nas mesmas condições, Wolff e Schreiner (1971) digeriram grânulos de queratohialina da epiderme humana em 30 minutos. Esta diferença de tempo não parece ter qualquer significado dado que pode ser atribuída apenas a variações no grau de oxidação e de espessura dos cortes. Wolff e Schreiner (1971) e Ugel (1971) e Wolff e Schreiner (1971) verificaram ainda, respectivamente, que os grânulos de queratohialina eram digeridos pela fosfolípase C e pela ribonucléase.

Estes achados *in situ* confirmam os resultados das análises bioquímicas de grânulos de queratohialina isolados, as quais evidenciaram predomínio de material proteico, sobretudo de ácidos aminados (Matoltsy e Matoltsy, 1970; Ugel, 1971; Tezuka e Freedberg, 1972; Ugel e Idler, 1972) e ARN (Ugel e Idler, 1972). A presença de lípidos (Matoltsy e Matoltsy, 1972; Tezuka e Freedberg, 1972), mais particularmente de fosfolípidos (Matoltsy e Matoltsy, 1972), explicaria a diminuição da densidade observada após a oxidação (Merriam, 1958).

Finalmente, colhemos alguns aspectos sugestivos da transformação das células granulosas em células córneas. Observámos que, tanto a queratohialina como a matriz das células queratinizadas, exibiam positividade à reacção do DDD de Barrnett e Seligman após redução dos cortes pelo ácido tioglicólico e que ambas coravam, em cortes semifinos, de azul arroxeado com o ácido peracético. Acresce que obtivemos certas imagens ultrastruturais sugestivas da transformação e esbatimento dos grânulos de queratohialina por um lado e do núcleo por outro, no seio do material queratínico que preenche as células córneas (Figs. 114 e 115).

Lavker e Matoltsy (1970) propuseram que a transformação das células granulosas no epitélio ruminal do carneiro se iniciava pela libertação de enzimas hidrolíticas que destruíam o núcleo e os organelos poupando, selectivamente, os filamentos e os grânulos de queratohialina. Simultaneamente, haveria síntese de uma proteína no retículo endoplásmico, a qual formaria, juntamente com a queratohialina, a matriz das células córneas. Finalmente, dar-se-ia passagem de material lisado através da membrana celular e sua acumulação nos espaços intercelulares No nosso material não notámos actividade fosfatásica nas células em queratinização, nem observámos exteriorização de materiais através da membrana celular espessada pela banda marginal. Pensamos, por isso, que o material resultante da transformação dos componentes das células granulosas seja directamente aproveitado na estruturação da matriz e da banda marginal das células córneas sem necessidade de degradação catalisada pelas hidrólases. A queratina assim formada irá incorporar-se no sebo participando na sua composição final.

Nas glândulas prepuciais do rato, Montagna e Noback (1946) observaram fluorescência esverdeada espontânea de média intensidade nos ácinos, no sebo recém-formado e no sebo do centro dos ductos principais, enquanto na periferia destes ductos o sebo apresentava fluorescência amarela. Estes resultados levaram aqueles autores a sugerir que a secreção se concentre, inicialmente, no centro do lume dos canais excretores e

se disperse, em seguida, para a periferia do lume. Alguns dos nossos achados morfológicos e citoquímicos apoiam esta sugestão. Efectivamente, notámos predomínio dos grânulos perinucleares e dos núcleos picnóticos de células secretoras em degenerescência no sebo do centro da porção intraglandular do canal excretor principal, enquanto na periferia sobressaíam as grandes massas cristalóides formações que representam, como demonstrámos, estádio mais avançado da evolução dos grânulos. Por outro lado, o facto de em cortes transversais das glândulas prepuciais observarmos convergência oblíqua dos ductos secundários no principal sugere que, na progressão do sebo, haja um movimento helicoidal.

CÉLULAS CLARAS

A identificação de células claras entre as células basais das unidades secretoras e dos canais excretores foi um achado da observação ultrastrutural que nos parece interessante discutir em virtude do seu interesse biológico geral. A escassez de organelos, a presença de pequenos grânulos densos e de prolongamentos finos e a ausência de desmosomas, levaram-nos a suspeitar que se tratasse de melanócitos ou de células de Langerhans, ambas já assinaladas anteriormente em glândulas sebáceas cutâneas (Montagna, 1963 a; Breathnack *et al.*, 1963). Contudo, a negatividade à reacção-DOPA, a ausência, nos grânulos, da estriação característica dos pré-melanosomas (Zelickson, 1967) e a falta dos grânulos típicos das células de Langerhans (Sagebiel e Reed, 1968), excluíram ambas as hipóteses.

Admitimos, então, poderem ser linfócitos intraepiteliais dada a semelhança ultrastrutural com os linfócitos intraepiteliais do intestino humano (Meader e Landers, 1967; Toner e Ferguson, 1971; Toner *et al.*, 1971; Otto, 1973), do rato (Meader e Landers, 1967; Collan, 1972), do ratinho e da cobaia (Meader e Landers, 1967). É curioso que a mesma variabilidade citoarquitectural que observámos no relativo à concentração dos orga-

nelos, número de ribosomas, conteúdo em grânulos e à frequência e comprimento das microvilosidades, foi igualmente referida por Toner e Ferguson (1971), Toner *et al.* (1971), Collan (1972) e por Otto (1973), naqueles linfócitos. Tais variações representariam, segundo Toner e Ferguson (1971), diferenças no grau da actividade celular. Também Toner e Ferguson (1971) e Collan (1972) descreveram corpos de inclusão semelhantes aos observados por nós. Deve acentuar-se, porém, que para Meader e Landers (1967) e Toner e Ferguson (1971) não seriam sinal de degenerescência celular.

Um dos aspectos mais interessantes que observámos no citoplasma das células claras consistiu na presença, nos corpos de inclusão, de grande número de ribosomas de dimensões iguais às dos ribosomas das células epiteliais vizinhas. Além disso, observámos aparente envolvimento de células epiteliais por pseudópodes das células claras. David-Ferreira e Pereira (1973) viram em linfócitos intraepiteliais do epidídimo do rato, corpos heterofágicos semelhantes a estes, contendo material dos grânulos de secreção das células epiteliais. Se bem que estes achados pareçam surpreendentes em linfócitos, supomos possível, como admitiram Hoffer *et al.* (1973), que as condições que estas células encontram nos epitélios, após abandonarem a circulação, possam levar à sua transformação em macrófagos. A este respeito, Hirschhorn *et al.* (1967) e Douglas *et al.* (1967) mostraram que a fitohemaglutinina e a *Phytolaca americana* estimulam *in vitro* a formação de grânulos ricos em hidrólases ácidas em linfócitos humanos, enquanto Collan (1972) viu citosomas sugestivos de fagocitose nos linfócitos do epitélio do íleo normal do rato.

Se as células claras que apresentámos são, como supomos, linfócitos intraepiteliais, põe-se o problema do seu papel nas glândulas sebáceas prepuciais do rato. Uma vez que no sebo destas glândulas há bactérias (Beaver, 1960), afigura-se-nos aceitável a existência de células imunocompetentes no epitélio dos canais excretores. Foi, aliás, na parede do ducto principal que observámos maior número de células claras, mais mar-

cada variabilidade morfológica e mais numerosas e extensas microvilosidades.

Pensámos que a descoberta destas células nestas glândulas possa ser um achado curioso cujo significado venha a ser elucidado no futuro.

RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho estuda-se a citologia fina do processo de diferenciação e desagregação holócrina e a citoquímica dos materiais de secreção sebáceos. Utilizou-se a glândula sebácea prepucial do rato pela facilidade com que nela, ao contrário do que sucede nas glândulas cutâneas, se acompanham as transformações ultrastruturais das células e pela constância com que reage aos estímulos hormonais.

As unidades secretoras desta glândula são formadas por túbulos amplos em cujo contorno se notam bosseladuras — os ácinos. A unidade secretora é revestida por *células basais,* únicas que se dividem; o índice mitótico, determinado após injecção de colquicina, foi de 2,7 p. 100 nos ácinos e 0,3 p. 100 na parede não bossselada dos túbulos. Somente as células basais dos ácinos dão origem a células que se diferenciam. As células basais são ricas em ribosomas livres, contêm cisternas dispersas parcialmente revestidas por ribosomas (RER), complexo de Golgi perinuclear, alguns corpos densos e escassas gotículas lipídicas sem membrana, não associadas a qualquer organelo. O núcleo, com cromatina pouco densa predominantemente periférica, tem um ou mais nucléolos com nucleolonemas típicos.

As *células em início de diferenciação* preenchem os ácinos e contêm numerosas gotículas lipídicas sem membrana limi-

tante, contíguas a túbulos anastomosados de parede lisa que constituem áreas arredondadas ou rodeiam completamente as gotículas lipídicas. Apresentam também grânulos perinucleares, rodeados de membrana, de matriz predominantemente clara, com frequência junto do Golgi. A matriz dos grânulos perinucleares, as vesículas do Golgi e os pequenos corpos densos têm actividade de fosfátase ácida; a primeira apresenta também actividade de β-glucuronídase. Em alguns grânulos observam-se cristalóides densos. As mitocôndrias são numerosas e dispersas por toda a célula. As cisternas do RER são abundantes, frequentemente dilatadas e contíguas aos grânulos perinucleares. As *células diferenciadas* localizam-se no lúmen central das unidades secretoras, têm mais gotículas lipídicas e grânulos perinucleares predominantemente de matriz densa, na maioria dos quais existem cristalóides. A associação entre as gotículas lipídicas e os aglomerados de retículo liso é muito pronunciada e o retículo rugoso mais extenso e dilatado. As *células completamente diferenciadas,* muito volumosas, contêm número máximo de gotículas lipídicas e grânulos perinucleares, quase todos de matriz densa, mas menor quantidade de elementos dos retículos rugoso e liso, de ribosomas livres, e de elementos do complexo de Golgi. Há alguns corpos autofágicos.

A *desagregação celular* manifesta-se, na transição para a luz dos canais excretores, pela rotura das membranas perinuclear e plasmática, cromatina densa e homogénea, nucléolos em anel ou compactos, e numerosos corpos autofágicos no citoplasma, contendo porções invaginadas do RER, ribosomas e materiais citoplasmáticos heterogéneos. Nos corpos autofágicos mais volumosos há actividade de fosfátase ácida. Quando a desintegração celular se completa, libertam-se as gotículas lipídicas, os grânulos perinucleares e os corpos autofágicos. Os grânulos perinucleares rompem-se e as suas hidrólases aparecem dispersas no fundo heterogéneo entre os cristalóides inalterados.

As *gotículas lipídicas* coram pelo Negro de Sudão B e pelo *Oil red O,* tingem-se de preto pelo método de OTAN e de róseo

pelo sulfato do azul do Nilo e são extraídas pela acetona. Não coram com os métodos da hemateína ácida de Baker, de Holczinger e PAN de Adams, nem pela reacção de Schultz. São mais volumosas nos machos que nas fêmeas; o seu diâmetro médio e a associação com o retículo liso, aumentam após a injecção da testosterona, nas fêmeas, e diminuem, nos machos, com a orquidectomia ou a injecção de estradiol.

A matriz clara e densa e os cristalóides dos *grânulos perinucleares* coram pelas reacções do tetrazónio acoplado e do DDD após redução pelo ácido tioglicólico e são digeríveis pela prónase. A matriz é positiva ao PAS e à reacção do ácido periódico/metenamina-prata. Os cristalóides e a matriz densa são Baker-positivos, osmiófilos, uranofílicos, oxidáveis pelo peróxido de hidrogénio e têm afinidade discreta pelo citrato de chumbo. A injecção de testosterona nas fêmeas aumenta a concentração dos grânulos perinucleares e provoca hiperplasia do retículo endoplásmico rugoso.

Nos *canais excretores* secundários, as células suprajacentes às basais possuem pequenos corpos microvesiculares e multigranulosos e grânulos mais volumosos de matriz Baker-positiva, com actividade de fosfátase ácida e de β-glucuronídase. Na superfície do epitélio dos canais excretores secundários de maior calibre observam-se células córneas não antecedidas de células com grânulos de queratohialina. O epitélio do canal excretor principal é estratificado pavimentoso e exibe queratinização «mole» típica. Entre as células basais das unidades secretoras e dos canais excretores observam-se *células claras,* dotadas de pseudópodes, pobres em organelos, que apresentam pequenos corpos densos e, por vezes, áreas rodeadas de membrana com ribosomas e restos celulares no interior.

Estes resultados permitiram enunciar as seguintes *Conclusões:*

1. A renovação do parênquima da glândula sebácea prepucial é operada pelas células basais das unidades secretoras.

A mais intensa actividade mitótica em certas zonas do contorno das unidades provoca a formação local de ácinos onde se inicia a diferenciação celular.

2. Os dois fenómenos essenciais da diferenciação são a formação e o crescimento de gotículas lipídicas e a produção de lisosomas especiais de secreção, os grânulos perinucleares.

3. As gotículas lipídicas, desprovidas de membrana e de conteúdo predominantemente triglicerídico, desenvolvem-se no hialoplasma em íntimo contacto com túbulos neoformados de retículo endoplásmico liso.

4. Os grânulos perinucleares originam-se no aparelho de Golgi do qual recebem a membrana limitante e a matriz clara de natureza glicoproteica e dotada de actividade de fosfátase ácida e de β-glucuronídase.

5. Durante o seu crescimento, os grânulos perinucleares são contíguos ao retículo endoplásmico rugoso dilatado e passam a conter cristalóides densos, de composição fosfolipídica-proteica, e a apresentar matriz densa com fosfolípidos acrescentados às glicoproteínas e enzimas preexistentes.

6. A involução celular revelou-se pelo aparecimento de corpos autofágicos formados a partir de cisternas do RER e do aparelho de Golgi, nos quais se inicia a degradação do citoplasma com discreta participação de fosfátase ácida oriunda de pequenos corpos densos.

7. A formação do sebo efectua-se em duas fases. A rotura da membrana plasmática liberta as gotículas lipídicas, os corpos autofágicos e os grânulos perinucleares. A desagregação subsequente destes permite a difusão das suas hidrólases que completam a digestão dos elementos protoplasmáticos. Os cristalóides permanecem inalterados, agregando-se nas grandes massas cristalóides do sebo.

8. Os canais excretores contribuem para a composição do sebo com hidrólases e fosfolípidos provenientes de grânulos especiais, com detritos celulares e com queratina. Nos canais excretores secundários de maior calibre ocorre queratinização na ausência da queratohialina.

9. Nas unidades secretoras e nos canais excretores assinalam-se células claras que parecem ser linfócitos intraepiteliais.

10. A síntese lipídica e a produção de grânulos perinucleares são estimuladas pelos androgénios e traduzem-se, respectivamente, por aumento do volume das gotículas lipídicas e do número dos grânulos perinucleares cujo volume máximo parece constante. Os estrogénios têm efeito contrário.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

In this work the fine morphology of the process of holocrine differentiation and disintegration is studied, as well as the cytochemistry of sebaceous secretion materials. The sebaceous preputial gland of the rat was used because of the facility with which it is possible to follow the ultrastructural changes occurring during differentiation, and the regularity of its reactions to hormonal stimulation.

The gland secretory units are made up of large tubules with round projections, the acini, at the periphery. The whole unit is lined by *basal cells* undergoing division. Mitotic index determined after colchicine injection was 2.7 per cent in acini and 0.3 per cent in the rest of the secretory unit. Acinar basal cells give rise to differentiating cells. The former are rich in ribosomes, contain scattered cisternae partly coated with ribosomes (RER), a perinuclear Golgi complex, small dense bodies, and a few lipid droplets with no limiting membrane which are not associated to any particular organelle. Cell nuclei have chromatin condensed in peripheral masses and nucleoli with typical nucleolonema.

Early differentiating cells occupy the acinar lumen and contain numerous not membrane-bound lipid droplets contiguous to interconnected smooth-walled tubules, either condensed in round areas or surrounding the lipid droplets. They also have

perinuclear granules, which are membrane limited, usually have light matrix and are found in the vicinity of Golgi vesicles. The granule matrix, the Golgi vesicles and the dense bodies have acid phosphatase activity, the former being also β-glucuronidase-positive. Some granules contain a dense crystalloid. Mitochondria are numerous and widespread; RER cisternae are abundant, frequently dilated, and contiguous to perinuclear granules. *Differentiated cells* are located in the center of secretory units, contain more lipid droplets and more perinuclear granules often with dense matrix and crystalloids. Lipid droplet association with the smooth reticulum is more pronounced and the RER more extensive and dilated. *Fully differentiated cells* are very large, contain the highest quantity of secretory material but a lesser amount of endoplasmic reticulum elements, free ribosomes, and Golgi components. There are some autophagic bodies.

Cell disintegration takes place at the transition to the excretory ducts, being characterised by rupture of nuclear and plasma membranes, dense homogeneous chromatin masses, ring-shaped or compact nucleoli, and a large number of autophagic bodies containing invaginated portions of the RER, ribosomes and various cytoplasmic debris. Large autophagic bodies show acid phosphatase activity. When disintegration is completed, lipid droplets, perinuclear granules and autophagic bodies are discharged into the sebum. Perinuclear granules then break up, while acid hydrolases appear on the background among crystalloids.

Lipid droplets are stained by Sudan Black B and Oil red O, appear black after the OTAN method and rose after Nile blue sulphate and are extracted by acetone. They are negative to the Baker-test, the Holczinger and PAN stainings and the Schultz reaction. They are larger in male than in female animals; mean diameter and the association with the smooth reticulum are markedly increased after testosterone administration to female rats, the reverse occurring after estrogen injection or orchiectomy in the male.

In *perinuclear granules,* the light and dense matrix and the crystalloids are positive to the coupled tetrazonium reaction and the DDD reaction after treatment with thioglycollate, and pronase-labile. The granule matrix is PAS-and PA/silver--metenamine-positive. The dense matrix and the crystalloids are Baker-positive, osmiophilic, uranophilic, oxidisable by hydrogen peroxide, and show moderate affinity to lead citrate. Testosterone injection to female animals increases the concentration of perinuclear granules per unit surface and causes hyperplasia of the rough endoplasmic reticulum.

In secondary *excretory duct* walls, the cells next to basal cells contain small multivesicular and multigranular bodies, and larger granules with matrix which is Baker-, acid phosphatase--and β-glucuronidase-positive. At the surface, keratinized cells are present despite the lack of a granular layer. The epithelium of the main excretory duct is stratified squamous and it is the site of typical «soft» keratinization. Among the basal cells of the secretory units and excretory ducts, *clear cells* were observed with numerous pseudopodia, which are poor in organelles but have small dense bodies and may show membrane--bound areas containing ribosomes and cell debris.

These data permitted to draw the following *Conclusions:*

1. Renewal of the sebaceous preputial gland secretory units is made by basal cells. The high mitotic activity in certain segments of the contour of the secretory units leads to local formation of acini in which cell differentiation occurs.

2. The two main features of cell differentiation are the formation and growth of lipid droplets and the production of special secretion lysosomes, the perinuclear granules.

3. Lipid droplets are not membrane limited and mostly consist of triglycerides. They appear in the hyaloplasm in close association with newly-formed networks of smooth-walled tubules.

4. Perinuclear granules originate from the Golgi complex from which they receive the membrane and a light interior matrix made up of glycoproteins and endowed with acid phosphatase and β-glucuronidase activities.

5. During their growth, perinuclear granules are close to dilated cisternae of the rough endoplasmic reticulum, and acquire dense crystalloids made up of phospholipids and protein; the matrix becomes dense and contains phospholipids in addition to preexisting glycoproteins and enzymes.

6. Cell involution is indicated by the appearance of autophagic bodies in the cytoplasm, arising from changed cisternae of the endoplasmic reticulum and the Golgi. Protoplasm degradation in autophagic bodies seems to occur with mild participation of acid phosphatase coming from small dense bodies.

7. Sebum formation is carried out in two stages. Plasma membrane is first ruptured and the lipid droplets, autophagic bodies and perinuclear granules are set free from the disintegrated cells. Subsequent disaggregration of the granules allows diffusion of their hydrolases which complete the lysis of the cell components.

8. Excretory ducts contribute to the sebum composition with hydrolases and phospholipids contained in certain epithelial cell granules, as well as with desquamated cell debris and keratin. In large secondary excretory ducts keratinization occurs in the absence of keratohyalin.

9. In secretory units and in excretory duct walls, clear cells are formed which are likely to be intraepithelial lymphocytes.

10. Lipid synthesis and the formation of perinuclear granules are under the stimulating influence of androgens which cause volume increase in lipid droplets and an augmentation of the number of perinuclear granules, the latter apparently never exceeding a certain size. Estrogens exert effects contrary to those of androgens.

BIBLIOGRAFIA

Adachi, K. e Kano, M.: The role of receptor proteins in controlling androgen action in the sebaceous glands of hamsters. *Steroids, 19:* 567, 1972.

Adams, C. W. M.: Neurohistochemistry. Edit. por C. W. M. Adams, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1965.

Adams, C. W. M., Abdulla, Y. H., Bayliss, O. B. e Weller, R. O.: The reaction of Backer's chromate reagent with lipids. *J. Histochem. Cytochem., 13:* 410, 1965.

Allison, V. F. e Cearly, G. W.: Electron microscopic study of cells within epithelium of the seminal vesicle of aging rats. *Anat. Rec., 172:* 262 (abstract), 1972.

Anderson, A. J. e Mclagan, N. F.: The isolation and estimation of urinary mucoproteins. *Biochem. J., 59:* 638, 1955.

Ando, H., Tarutani, M. e Izumi, A.: Sebaceous excretion and endocrine function. II. Rat sebum agglutinated at hair fat and the influence of sexual steroid on it. *Folia Endocrinol. Jap., 38:* 671, 1962.

Baillie, A. H., Calman, K. C. e Milne, J. A.: Histochemical distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in human skin. *Br. J. Dermatol., 77:* 610, 1965.

Baillie, A. H., Thomson. J. e Milne, J. A.: The distribution of hydroxysteroid dehydrogenase in human sebaceous glands. *Br. J. Dermatol., 78:* 451, 1966.

Bancroft, J. D.: An introduction to histochemical technique. Edit. por Butterworth e Co. (Publishers) LTD., London, 1967.

Bardin, C. W., Bullock, L., Schneider, G., Allison, J. E. e Stanley, A. J.: Pseudohermaphrodite rat: end organ insensitivity to testosterone. *Science, 167:* 1136, 1970.

Barka, T. e Anderson, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem., 10:* 741, 1962.

Barka, T. e Anderson, P. J.: Histochemistry: theory, practice and bibliography. Edit. por Hoeber Medical Division, Harper e Row, Publishers, New York, 1963.

Barton, P. G.: The influence of surface change density of phosphatides on the bidding of some cations. *J. Biol. Chem., 243:* 3884, 1968.

Bauer, F. W.: Differentiation and keratinization of fetal rat skin. II. Ultrastructural study of the epidermis *in vivo* and *in vitro. Dermatologica, 145:* 16, 1972.

Beaver, D. L.: Der Einfluss verschiedener Fixierungsmittel auf das Strukturbild der Präputialdrüsen der Ratte. *Z. Zellforsch., 51:* 88, 1959.

Beaver, D. L.: A re-evaluation of the preputial gland as a «dicrine» organ from the standpoint of its morphology, histochemistry and physiology. *J. Exp. Zool., 143:* 153, 1960.

Beaver, D. L.: Electron microscopy of the acinar cell of the rat preputial gland. *Anat. Rec., 146:* 47, 1963.

Bell, M.: A comparative study of sebaceous gland ultrastructure in subhuman primates. I. *Galago crassicaudatus, G. senegalensis e G. demidovii. Anat. Rec., 166:* 213, 1970.

Bell, M.: A comparative study of sebaceous gland ultrastructure in subhuman primates. II. Macaques: crystalline inclusions in the sebaceous cells of *Macaca mulatta, M. nemestrina, M. speciosa, M. fascicularis. J. Cell Biol., 49:* 932, 1971.

Bell, M.: A comparative study of the ultrastructure of the sebaceous glands of man and other primates. *J. Invest. Dermatol., 62:* 132, 1974 a.

Bell, M.: Effect of androgen on the ultrastructure of the sebaceous gland in two species. *J. Invest. Dermatol., 62:* 202, 1974 b.

Bell, M. e Kellum, R. E.: Early formation of keratohyalin granules in rat epidermis. *Acta Derm. Venereol.* (Stockholm), *47:* 350, 1967.

Bergman, P. e Werner, I.: *Acta Obstet. Gynecol. Scand., 30:* 273, 1951, citado por Conchie, J. e Findlay, J., *J. Endocrinol., 18:* 132, 1959.

Bertalanffy, F. D.: Mitotic activity and renewal rate of sebaceous gland cells in the rat. *Anat. Rec., 129:* 231, 1957.

Bessis, M.: Cellules du sang normal et pathologique. Edit. por Masson et Cie., Paris, 1972.

Bey, K.: Die Analyse von Hautfetten aus getragener Wäsche. I. Fette, Seifen, Anstrichmittel, *65:* 611, 1963.

Beyler, A. L. e Szego, C. M.: Endocrine regulation of beta-glucuronidase activity. *Am. J. Physiol., 167:* 768, 1951.

Beyler, A. L. e Szego, C. M.: Steroid hormone interactions as evidenced by modification of β-glucuronidase activity of the preputial glands of the rat. *Endocrinology, 54:* 334, 1954 a.

Beyler, A. L. e Szego, C. M.: Correlation of ovarian cholesterol levels with changes in β-glucuronidase activity of reproductive tract during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology, 54:* 323, 1954 b.

Bonneville, M. A.: Observations on epidermal differentiation in the fetal rat. *Am. J. Anat., 123:* 147, 1968.

Boughton, B., Mackenna, R. M. B., Wheatley, V. R. e Wormall, A.: Studies of sebum 8. Observations on the squalene and cholesterol content of sebum and the possible function of squalene in human sebum. *Biochem. J., 66:* 32, 1957.

Brandes, D., Bertini, F. e Smith, E. W.: Role of lysosomes in cellular lytic processes. II. Cell death during holocrine secretion in sebaceous glands. *Exp. Mol. Pathol., 4:* 245, 1965.

Breathnack, A. S., Birbeck, M. S. e Everall, J. D.: Observations bearing on the relationship between Langerhans cells and melanocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 100:* 223, 1963.

Brody, I.: An electron microscopic study of the fibrillar density in the normal human stratum corneum. *J. Ultrastruct. Res., 30:* 209, 1970.

Brown, J. C. e Williams, J. D.: A histochemical study of the preputial glands of male laboratory rat and mouse. *Acta Anat., 81:* 270, 1972.

Bruchovsky, N. e Wilson, J. D.: The conversion of testosterone to 5 α-androstan-17β ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro J. Biol. Chem., 243:* 2012, 1968.

Bullock, L. e Bardin, C. W.: Decreased dihydrotestosterone retention by preputial gland nuclei from the androgen insensitive pseudohermaphrodite rat. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 31:* 113, 1970.

Bullock, L. e Bardin, C. W.: *In vivo* and *in vitro* testosterone metabolism by the androgen insensitive rat. *J. Steroid Biochem., 4:* 139, 1973.

Bullough, W. S.: Mitotic activity in the adult male mouse, *Mus musculus L.* The diurnal cycles and their relation to waking and sleeping. *Proc. R. Soc. Lond.* (Biol.), *135:* 212, 1948.

Bullough, W. S.: Epidermal mitotic activity in the adult female mouse. *J. Endocrinol., 6:* 340, 1950.

Burdick, H. O. e Gamon, E.: Response of the preputial glands of the female mouse to testosterone propionate. *Endocrinology, 28:* 677, 1941.

Burgess, T. L. e Wilson, J. D.: Studies on hormonal regulation of squalene synthesis in the preputial gland and skin of rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113:* 747, 1963.

Burstone, M. S.: Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Edit. por Academic Press, New York, 1962.

Busch, H. e Smetana, K.: The nucleolus. Edit. por Academic Press, New York, 1970.

Cardell Jr., R. R., Badenhausen, S. e Porter, K. R.: Intestinal triglyceride absorption in the rat. An electron microscopical study. *J. Cell Biol., 34:* 123, 1967.

Caro, L. G. e Palade, G. E.: Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J. Cell Biol., 20:* 473, 1964.

Carruthers, C.: Fatty acid composition of the phosphatide and triglyceride fractions of human epidermis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115:* 215, 1964.

Cavazos, L. F., Anderson, L. L., Belt, W. D., Henricke, D. M., Draeling, R. R. e Melempy, R. M.: Fine structure and progesterone levels in the *corpus luteum* of the pig during the estrous cycle. *Biol. Reprod., 1:* 83, 1969.

Charles, A.: Electron microscopic observations of the human sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol., 35:* 31, 1960.

Chiffelle, T. L. e Putt, F. A.: Propylene and ethylene glycol as solvents for Sudan IV and Sudan Black B. *Stain Technol., 26:* 51, 1951.

Christensen, A. K.: The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J. Cell Biol., 26:* 911, 1965.

Clermont, Y., Glegg, R. E. e Leblond, C. P.: Presence of carbohydrates in the acrosome of the guinea-pig spermatozoan. *Exp. Cell Res., 8:* 453, 1955.

Coimbra, A. e Leblond, C. P.: Sites of glycogen synthesis in rat liver cells, as shown by electron microscope radioautography after administration of glucose-H^3. *J. Cell Biol., 30:* 151, 1966.

Collan, Y.: Characteristics of nonepithelial cells in the epithelium of normal rat ileum. A light and electron microscopical study. *Scand. J. Gastroentereol.* (Suppl.), *7:* 18, 1972.

Conchie, J. e Findlay, J.: Influence of gonadectomy, sex hormones and other factors, on the activity of certain glycosidases in the rat and mouse. *J. Endocrinol., 18:* 132, 1959.

Conchie, J., Findlay, J. e Levvy, G. A.: Mammalian glycosidases. Distribution in the body. *Biochem. J., 71:* 318, 1959.

Dahl, E. e Kjaerheim, A.: The ultrastructure of the acessory sex organs of the male rat. II. The post-castration involution of the ventral, lateral and dorsal prostate. *Z. Zellforsch., 144:* 167, 1973.

Dahl, E. e Tveter, K. J.: The ultrastructure of the acessory sex organs of the male rat. III. The post-castration involution of the coagulating gland and the seminal vesicle. *Z. Zellforsch., 144:* 179, 1973.

Dahl, E., Tveter K. J. e Kjaerheim, A.: The ultrastructure of the acessory sex organs of the male rat. IV. Effect of testosterone. *Acta Endocrinol.* (Kbh), *74:* 605, 1973.

Dangelo, J. G. e Munger, B. L.: The ultrastructure of the rat preputial gland. *J. Ultrastruct. Res., 11:* 230, 1964.

David-Ferreira, J. F. e Pereira, G. C.: As células intraepiteliais da vesícula seminal do rato. VIII Reunião da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica, Resumo das Comunicações, Luanda, 1973.

De Duve, C : The lysosome concept. *In* Lysosomes, *Ciba Foundation Symposium,* p. 1. Edit. por A. V. S. de Reuck e M. P. Cameron, Churchill, London, 1963.

De Duve, C. e Wattiaux, R.: Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol., 28:* 435, 1966.

Disselhorst, R.: Ausführapparat und Anhaugsdrüsen der männlichen Geschlechtsorgane. *In* A. Oppel's Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere. Edit. por Fischer, Jena, 1904.

Dorfman, R. 1. e Dorfman, A. S.: Assay of subcutaneously administered androgens on the chick's comb. *Acta Endocrinol.* (Kbh), *41:* 101, 1962.

Douglas, S. D., Hoffman, P. F., Borjeson, J. e Chessin, L. N.: Studies on human peripheral blood lymphocytes *in vitro.* III. Fine structural features of lymphocyte transformation pokeweed mitogen. *J. Immunol., 98:* 17, 1967.

Downing, D, T., Strauss, J. S. e Pochi, P. E.: Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. *J. Invest. Dermatol., 53:* 322, 1969.

Droz, B.: Protein metabolism in nerve cells. *Int. Rev. Cytol., 25:* 363, 1969.

Dubovyi, M. I.: Androgenic steroids in the sebum. *Vestn. Desmatol. Venerol., 41:* 14, 1967.

Duval, M.: Précis d'Histologie. Edit. por Masson et Cie., Paris, 1897.

Ebling, F. J.: Sebaceous glands. I. The effect of sex hormones on the sebaceous glands of the female albino rat. *J. Endocrinol., 5:* 297, 1948.

Ebling, F. J.: Changes in the sebaceous glands and epidermis during the oestrous cycle of the albino rat. *J. Endocrinol., 10:* 147, 1954.

Ebling, F. J.: Endocrine factors affecting cell replacement and cell loss in the epidermis and sebaceous glands of the female albino rat. *J. Endocrinol., 12:* 38, 1955.

Ebling, F. J.: The action of testosterone on sebaceous glands and epidermis in castrated and hypophysectomized male rats. *J. Endocrinol., 15:* 297, 1957 a.

Ebling, F. J.: The action of testosterone and oestradiol on the sebaceous glands and epidermis of the rat. *J. Embryol. Exp. Morphol., 5:* 74, 1957 b.

Ebling, F. J.: Failure of progesterone to enlarge sebaceous glands in the female rat. *Br. J. Dermatol., 73:* 65, 1961.

Ebling, F. J.: Hormonal control of sebaceous glands in experimental animals. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 200. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co , New York, 1963.

Ebling, F. J.: Hormonal control and methods of measuring sebaceous gland activity. *J. Invest. Dermatol., 62:* 161, 1974.

Ebling, F. J. e Skinner, J.: The measurement of sebum production in rats treated with testosterone and oestradiol. *Br. J. Dermatol., 79:* 386, 1967.

Ebling, F. J., Ebling, E. e Skinner, J.: The influence of pituitary hormones on the response of the sebaceous glands of the rat to testosterone. *J. Endocrinol., 45:* 245, 1969.

Ebling, F. J., Ebling, E. e Skinner, J.: The effects of thyrotrophic hormone and of thyroxine on the response of the sebaceous glands of the rat to testosterone. *J. Endocrinol., 48:* 83, 1970 a.

Ebling, F. J., Ebling, E., Skinner, J. e White, A.: The response of the sebaceous glands of hypophysectomized-castrated male rats to adrenocorticotrophic hormone and to testosterone. *J. Endocrinol., 48:* 73, 1970 b.

Ebling, F. J., Ebling, E., McCaffery, V. e Skinner, J.: The response of the sebaceous glands of the hypophysectomized-castrated male rat to 5 α-dihydrotestosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone and androsterone. *J. Endocrinol., 51:* 181, 1971.

Ehrenreich, J. H., Bergeron, J. J. M., Siekevitz, P. e Palade, G. E.: Golgi fractions prepared from rat liver homogenates. I. Isolation procedure and morphological characterisation. *J. Cell Biol., 59:* 45, 1973.

Eidinoff, M. L., Rosenfeld, R. S., Knoll, J. E., Marano, B. J. e Hellman, L.: The biosynthesis of squalene from acetate in man. *J. Clin. Invest., 33:* 333, 1954.

Ellis, R. A.: Eccrine, sebaceous and apocrine glands. *In* Ultrastructure of normal and abnormal skin, p. 132. Edit. por A. S. Zelickson, Lea e Febiger, Philadelphia, 1967.

Ellis, R. A. e Henrikson, R. C.: The ultrastructure of the sebaceous glands of man. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 94. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Essner, E.: Endoplasmic reticulum and the origin of microbodies in fetal mouse liver. *Lab. Invest., 17:* 71, 1967.

Etherton, J. E. e Botham, C. M.: Factores affecting lead capture methods for the fine localization of rat lung acid phosphatase. *Histochem. J., 2:* 507, 1970.

Fahimi, H. D. e Drochmans, P.: Essais de standardization de la fixation au glutaraldéhyde. I. Purification et détermination de la concentration du glutaraldéhyde. *J. Microscopie, 4:* 725, 1965.

Fang, S. e Liao, S.: Androgen receptors. *J. Biol. Chem., 240:* 16, 1971.

Farbman, A. I.: Plasma membrane changes during keratinization. *Anat. Rec., 156:* 269, 1966.

Farquhar, M. G. e Palade, G. E.: Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol., 26:* 263, 1965.

Fawcett, D. W.: An atlas of fine structure. *The cell. Its organelles and inclusions.* Edit. por W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1966.

Fishman, W. H. e Fishman, L. W.: The elevation of uterine β-glucuronidase activity by estrogenic hormone. *J. Biol. Chem., 152:* 487, 1944.

Fishman, W. H. e Ide, H.: The *de novo* synthesis of the endoplasmic reticulum glycoprotein, β-glucuronidase, in androgen-stimulated mouse kidney. *Seventh International Congress on Biochemistry,* p. 858, Tokyo, 1967.

Flamigni, C. A., Collins, W. P., Koullapis, E. N. e Sommerville, I. F.: Formation and metabolism of testosterone in rat skin. *Endocrinology, 87:* 764, 1970.

Flamigni, C. A, Collins, W. P., Koullapis, E. N., Craft, I., Dewhurst, C. J. e Sommerville, I. F.: Androgen metabolism in human skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 32:* 737, 1971.

Freeman, J. J., Hilf, R., Iovino, A. J. e Michel, I.: Effects of steroids upon the weight, protein and nucleic acid concentration of the preputial glands of the female rat. *Endocrinology, 74:* 990, 1964.

Freinkel, R. K.: The effect of age and sex on the metabolism of the preputial gland of the rat. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 125. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Freinkel, R. K.: The origin of free fatty acids in sebum. I. Role of coagulase negative *Staphylococci. J. Invest. Dermatol., 50:* 186, 1968.

Freinkel, R. K. e Aadalen, R. J.: Dietary deprivation and lipogenesis in a model sebaceous structure. *J. Invest. Dermatol., 42:* 325, 1964.

Freinkel, R. K. e Shen, Y.: The origin of free fatty acids in sebum. II. Assay of the lipases of the cutaneous bacteria and effects of *pH. J. Invest. Dermatol., 53:* 422, 1969.

Gallo, D. G.: Lipid synthesis by the rat preputial gland. *Fed. Proc., 25:* 766, 1966.

Ganter, P. e Jollès, G.: Histochimie normale et pathologique, Vols. I e II. Edit. por Gauthier-Villars, Paris, 1969.

Gegenbaur, C.: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere usw. Leipzig, 1898.

Giroud, A. e Leblond, C. P.: The keratinization of epidermis and its derivates. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 53:* 613, 1951.

Gittinger, J. W. e Lasnitzki, I.: The effect of testosterone and testosterone metabolites on the fine structure of the rat prostate gland in organ culture. *J. Endocrinol., 52:* 459, 1972.

Goldfischer, S.: The cytochemical demonstration of lysosomal aryl sulfatase activity by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem., 13:* 520, 1965.

Goldfischer, S., Kikkawa, Y. e Hoffman, L.: The demonstration of acid hydrolase activities in the inclusion bodies of type II alveolar cells and other lysosomes in the rabbit lung. *J. Histochem. Cytochem., 16:* 102, 1968.

Gomez, E. C. e Hsia, S. L.: *In vivo* metabolism of testosterone-4-C^{14} and Δ 4-androstene-3,17 dione-4-C^{14} in human skin. *Biochemistry, 7:* 24, 1968.

Gottschalk, A. e Ada, G. L.: The separation and quantitative determination of the component sugars of mucoproteins. *Biochem. J., 62:* 681, 1956.

Grandjean, A. M.: Contribution à l'histophysiologie de la glande clitoridienne de la ratte albinos. *Arch. Anat. Micr. Morpholol., Exp., 48:* 161, 1959.

Griesemer, R. D. e Thomas, R. W.: Lipogenesis in human skin. III Variation with body site. *J. Invest. Dermatol., 41:* 325, 1963.

Grimley, P. M.: A tribasic stain for thin sections of plastic-embedded, OsO_4-fixed tissues. *Stain Technol., 39:* 229, 1964.

Haahti, E.: Major lipid constituents of human skin surface with special reference to gas chromatography methods. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (suppl. 59), *13:* 1, 1961.

Ham, A. W.: Histology, 6.ª edição. Edit. por J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1969.

Hamilton, J. B.: Male hormone substance: a prime factor in acne. *J. Clin. Endocrinol., 1:* 570, 1941.

Hamilton, J. B. e Mestler, G. E.: Low values for sebum in eunuchs and oophorectomized women. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112:* 374, 1963.

Hamilton, J. B. e Monagna, W.: The sebaceous glands of the hamster. I. Morphological effects of androgens on integumentary structures. *Am. J. Anat., 86:* 191, 1950.

Hashimoto, K., Dibella, R. J. e Shklar, G.: Electron microscopic studies of the normal human buccal mucosa. *J. Invest. Dermatol., 47:* 512, 1966.

Hashimoto, K., Gross, B. G., Nelson, R. e Lever, W. F.: The ultrastructure of the skin of human embryos. III. The formation of the nail in 16-18 weeks old embryos. *J. Invest. Dermatol., 47:* 205, 1966.

Haskin, D., Lasher, N. e Rothman, S.: Some effects of ACTH, cortisone, progesterone, and testosterone on sebaceous glands in the white rat. *J. Invest. Dermatol., 20:* 207, 1953.

Hayashi, M.: Distribution of β-glucuronidase activity in rat tissues employing the naphtol AS-BI glucuronidase hexazonium pararosaniline method. *J. Histochem. Cytochem., 12:* 659, 1964.

Hayashi M.: Histochemical demonstration of N-acetyl-β-glucuronidase employing naphtol AS-BI N-acetyl-β -glucosaminide as substrate. *J. Histochem. Cytochem., 13:* 355, 1965.

Hayashi, M.: Comparative histochemical localization of lysosomal enzymes in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem., 15:* 83, 1967.

Hayward, A. F.: Electron microscopic observations on cell coat and membrane-coating granules of the epithelium of the hard and soft palate in the rat. *Arch. Oral Biol., 18:* 67, 1973.

Hayward, A. F. e Hackemann, M.: Electron microscopy of membrane--coating granules and a cell surface coat in keratinized and nonkeratinized human oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res., 43:* 205, 1973.

Helminen, H. J. e Ericsson, J. L. E.: Studies on mammary gland involution. I. On the ultrastructure of the lactating mammary gland. *J. Ultrastruct. Res., 25:* 193, 1968 a.

Helminen, H. J. e Ericsson, J. L. E.: Studies on mammary gland involution. II. Ultrastructural evidence for auto- and heterophagocytosis. *J. Ultrastruct Res., 25:* 214, 1968 b.

Helminen, H. J. e Ericsson, J. L. E.: On the mechanism of lysosomal enzyme secretion. Electron microscopic and histochemical studies on the epithelial cell of the rat's ventral prostate lobe. *J. Ultrastruct. Res., 33:* 528, 1970.

Helminen, H. J. e Ericsson, J. L. E.: Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. *J. Ultrastruct. Res., 36:* 708, 1971.

Helmy, F. M. e Hack, M. H.: Comparative lipid biochemistry. V. The neutral lipid plasmalogens and other lipids of some specialized sebaceous glands. *Comp. Biochem. Physiol.* (B), *23:* 329, 1967.

Henrikson, R. C.: Glycogen and sebaceous transformation. *J. Invest. Dermatol., 44:* 435, 1965.

Hibbs, R. G.: Electron microscopy of human axillary sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol., 38:* 329, 1962.

Hirschhorn, R., Hirschhorn, K. e Weissmann, G.: Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by phytohemaglutinin and antigens. *Blood, 30:* 84, 1967.

Hodgins, M. B. e Hay, J. B.: The metabolism of androgens in rat preputial glands. *Steroids, 21:* 307, 1973.

Hoffer, A. P., Hamilton, D. W. e Fawcett, D. W.: The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec., 175:* 169, 1973.

Hooker, C. W. e Pfeiffer, C. A.: Effects of sex hormones upon body growth, skin, hair and sebaceous glands in the rat. *Endocrinology, 32:* 69, 1943.

Horner, W. E.: On the odoriferous glands of the negro. *Am. J. Med. Sci., 21:* 13, 1846.

Howard, A. N. e Wild, F.: The reactions of diazonium compounds with amino acids and proteins. *Biochem. J., 65:* 651, 1957.

Hsia, S. L., Fulton Jr., J. E., Fulghum, D. e Buch, M. M.: Lipid synthesis from acetate-l-^{14}C by suction blister epidermis and other skin components. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135:* 285, 1970.

Huggins, C., Parsons, F. M. e Jensen, E. V.: Promotion of growth of preputial glands by steroids and the pituitary growth hormone. *Endocrinology, 57:* 25, 1955.

Hyman, A. B. e Guidocci, A. A.: Ectopic sebaceous glands. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 78. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Ichihara, I., Santti, R. S. e Pelliniemi, L. J.: Effects of testosterone, hydrocortisone and insulin on the fine structure of the epithelium of rat ventral prostate in organ culture. *Z. Zellforsch., 143:* 425, 1973.

Jacot, B. e Selye, H.: A nonadrenal mediated action of ACTH on the preputial gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78:* 64, 1951.

Jarret, A.: The effects of progesterone and testosterone on surface sebum and acne vulgaris. *Br. J. Dermatol., 71:* 102, 1959.

Jenkis, J. S. e Ash, S.: The metabolism of testosterone by skin in normal subjects and in testicular feminization. *J. Endocrinol., 49:* 515, 1971.

Jennings, B. M., Farquhar, M. G. e Moon, H. D.: Staining methods for osmium-methacrylate sections. *Am. J. Pathol., 35:* 991, 1959.

Jessen, H.: Two types of keratohyalin granules. *J. Ultrastruct. Res., 33:* 95, 1970.

Jessen, H.: Electron cytochemical demonstration of sulfhydryl groups in keratohyalin granules and in the peripheral envelope of cornified cells. *Histochemie, 33:* 15, 1973.

Jones, D.: Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. *Histochem. J., 4:* 421, 1972.

Karásek, J., Hrdlicka, A. e Smetana, K.: Studies on the nuclear and nucleolar ultrastructure in differentiating and differentiated human sebaceous cells. *J. Ultrastruct. Res., 42:* 234, 1973.

Karlson, P. e Butenandt, A.: *Annu. Rev. Entomol., 4:* 39, 1959, citado por Parkes, A. S. e Bruce, H. M., *Science, 134:* 1049, 1961.

Karunakaran, M. E., Pochi, P. E., Strauss, J. S., Valerio, E. A., Wotiz, H. H. e Clark, S. J.: Androgens in skin surface lipids. *J. Invest. Dermatol., 60:* 121, 1973.

Kellum, R. E.: Isolation of human sebaceous glands. *Arch. Dermatol., 93:* 610, 1966.

Kellum, R. E.: Human sebaceous gland lipids. *Arch. Dermatol., 95:* 218, 1967.

Kellum, R. E. e Strangfeld, K.: Triglyceride hydrolysis by *Corynebacterium acnes in vitro. J. Invest. Dermatol., 52:* 255, 1969.

Kellum, R. E., Strangfeld, K. e Ray, L. F.: Acne vulgaris studies in pathogenesis: triglyceride hydrolysis by *Corynebacterium acnes in vitro. Arch. Dermatol., 101:* 41, 1970.

Kellum, R. E., Toshitani, S. e Strangfeld, K.: Human sebaceous gland lipids: *in vitro* incubations with ^{14}C-labelled compounds. *J. Invest. Dermatol., 60:* 53, 1973.

Kligman, A. M. e Shelley, W. B.: An investigation of the biology of the human sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol., 30:* 99, 1958.

Korenchevsky, V. e Dennison, M.: The effect of oestrone on normal and castrated male rats. *Biochem. J., 28:* 1474, 1934 a.

Korenchevsky, V. e Dennison, M.: The effect on male rats of the simultaneous administration of male and female sex hormones and the relation to assay of the hormones. *Biochem. J., 28:* 1487, 1934 b.

Korenchevsky, V. e Dennison, M.: Histological changes in the organs of rats injected with oestrone alone or simultaneously with oestrone and testicular hormone. *J. Pathol. Bacteriol., 41:* 323, 1935.

Korenchevsky, V. e Dennison, M.: The histology of the sex organs of ovariectomized rats treated with male or female sex hormones alone or with both simultaneously. *J. Pathol. Bacteriol., 42:* 91, 1936 a.

Korenchevsky, V. e Dennison, M.: The histological changes in sex organs of spayed animals induced by testosterone and oestrone. *Biochem. J., 42:* 345, 1936 b.

Korn, E. D.: A chromatographic and spectrophotometric study of the products of the reaction of osmium tetroxide with unsaturated lipids. *J. Cell Biol., 34:* 627, 1967.

Lasher, N., Lorincz, A. L. e Rothman, S,: Hormonal effects on sebaceous glands in the white rat. II. The effect of the pituitary-adrenal axis. *J. Invest. Dermatol., 22:* 25, 1954.

Lasher, N., Lorincz, A. L. e Rothman, S.: Hormonal effects on sebaceous glands in the white rat. III. Evidence for the presence of a pituitary sebaceous gland tropic factor. *J. Invest. Dermatol., 24:* 499, 1955.

Lavker, R. M.: Fine structure of clear cells in frog epidermis. *Tissue & Cell, 3:* 567, 1971.

Lavker, R. M.: Fine structure of the newt epidermis. *Tissue & Cell, 4:* 663, 1972.

Lavker, R. M. e Matoltsy, A. G.: Formation of horny cells. The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. *J. Cell Biol., 44:* 501, 1970.

Leeson, C. R.: Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. *Acta Anat., 52:* 34, 1963.

Levvy, G. A., McAllan, A. e Marsh, C. A : Purification of β-glucuronidase from the preputial gland of the female rat. *Biochem. J., 69:* 22, 1958.

Leydig, F.: Zur Anatomie der Männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugetiere. *Z. Zool., 2:* 1, 1850.

Lillie, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. 3.ª edição. Edit. por Mc-Graw-Hill Book Company, New York, 1965.

Lison, L.: Histochimie et Cytochimie animales. Principes et méthodes. Vols. I e II, 3.ª edição. Edit. por Gauthier-Villars, Paris, 1960.

Lorincz, A. L: The effects of progesterone and pituitary preparation with sebotropic activity on sebaceous glands. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 188. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver. The MacMillan Co., New York, 1963.

Lorincz, A. L. e Lancaster, G.: Anterior pituitary preparation with tropic activity for sebaceous, preputial, and harderian glands. *Science, 126:* 124, 1957.

Lorincz, A. L. e Stoughton, R. B.: Specific metabolic processes of skin. *Physiol. Rev., 38:* 481, 1958.

Ludford, R. J.: The cytology of tar tumours. *Proc. R. Soc. Med.,* Série B, *98:* 557, 1925.

Luft, J. H.: Improvements in epoxy embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:* 409, 1961.

Lyne, A. G. e Hollis, D. E.: The structure and development of the epidermis in sheep fetuses. *J. Ultrastruct. Res., 38:* 444, 1972.

Mainwaring, W. I. P., Mangan, F. R. e Peterken, B. M: Studies on the solubilized ribonucleic acid polymerase from rat ventral prostate gland. *Biochem. J., 123:* 619, 1971.

Marois, M. e Salesses, A.: Contribution à l'étude histochimique de la glande préputiale du rat. *Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes,* 52ème Congrès, p. 854, Paris-Orsay, 1967.

Marples, R. R., Downing, D. T. e Kligman, A. M: Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes. J. Invest. Dermatol., 56:* 127, 1971.

Martan, J.: Effect of castration and androgen replacement on the supracaudal gland of the male guinea pig. *J. Morphol., 110:* 285, 1962.

Martan, J. e Price, D.: Comparative responsiveness of supracaudal and other sebaceous glands in male and female guinea pigs to hormones. *J. Morphol., 121:* 209, 1967.

Matoltsy, A. G.: Mechanism of keratinization. *In* Fundamental of keratinization, p. 1. Edit. por E. O. Butcher e R. F. Sognnaes, Washington, 1962.

Matoltsy, A. G. e Huszar, T.: Keratinization of the reptilian epidermis: an ultrastructural study of the turtle skin. *J. Ultrastruct. Res., 38:* 87, 1972.

Matoltsy, A. G. e Matoltsy, M. N.: The chemical nature of keratohyalin granules of the epidermis. *J. Cell Biol., 47:* 593, 1970.

Matoltsy, A. G. e Matoltsy, M. N.: The amorphous components of keratohyalin granules. *J. Ultrastruct. Res., 41:* 550, 1972.

Matoltsy, A. G. e Parakkal, P. F.: Membrane-coating granules of keratinizing epithelia. *J. Cell Biol., 24:* 297, 1965.

Matoltsy, A. G. e Parakkal, P. F.: Keratinization. *In* Ultrastructure of normal and abnormal skin, p. 76. Edit. por A. S. Zelickson, Lea e Febiger, Philadelphia, 1967.

McGee-Russel, S. M. e Smale, N. B.: On colouring epon-embedded tissue sections with Sudan black B or Nile blue A for light microscopy. *Q. J. Microsc. Sci., 104:* 109, 1963.

Meader, R. D. e Landers, D. F.: Electron and light microscopic observations on relationships between lymphocytes and intestinal epithelium. *Am. J. Anat., 121:* 763, 1967.

Merriam, R. W.: The contribution of lower oxides of osmium to the density of biological specimens in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 4:* 579, 1958.

Miles, A. E. W.: Sebaceous glands in oral and lip mucosa. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 46. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Miller, B. S. e Palade, G. E.: Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell Biol., 23:* 519, 1964.

Millonig, G.: Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Physics, 32:* 1637, 1961.

Monneron, A.: Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale. *J. Microscopie, 5:* 583, 1966.

Monneron, A. e Bernhard, W.: Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en Epon. *J. Microscopie, 5:* 697, 1966.

Montagna, W.: Histology and cytochemistry of human skin. VIII. Mitochondria in the sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol., 25:* 117, 1955.

Montagna, W.: The structure and function of the skin. Edit. por Academic Press, New York, 1956.

Montagna, W.: The skin of lemurs. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 102:* 190, 1962.

Montagna, W.: The sebaceous glands in man. *In* Advances in Biology of the Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 19. Edit, por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963 a.

Montagna, W.: Comparative aspects of sebaceous glands. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 32. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963 b.

Montagna, W.: Histology and cytochemistry of human skin. XXXV. The nipple and areola. *Br. J. Dermatol., 83:* 2, 1970.

Montagna, W. e Kennyon, P.: Growth potentials and mitotic division in the sebaceous glands of the rabbit. *Anat. Rec., 103:* 365, 1949.

Montagna, W. e Noback, C. R.: The histology of the preputial gland of the rat. *Anat. Rec., 96:* 41, 1946.

Montagna, W. e Noback, C. R.: The histochemistry of the preputial gland of the rat. *Anat. Rec., 96:* 111, 1946.

Montagna, W., Chase, H. B. e Hamilton, J. B : The distribution of glycogen and lipids in human skin. *J. Invest. Dermatol., 17:* 147, 1951.

Montagna, W., Chase, H. B. e Lobitz Jr., W. C.: Histology and cytochemistry of human skin. II. The distribution of glycogen in the epidermis, hair follicles, sebaceous glands and eccrine sweat glands. *Anat. Rec., 114:* 231, 1952.

Mowry, R W.: Histochemistry of carbohydrates. *In* The Carbohydrates. Edit. por Pigman, Academic Press, New York, 1957.

Muir, A. V., Hodgins, M. B., Milne, J. A. e Young, H.: The presence of hydroxysteroid dehydrogenases in mammalian sebaceous structures. *Br. J. Dermatol., 83:* 291, 1970.

Müller, C.: Über die Tysonschen Drüsen beim Menschen und einigen Säugetieren. Diss. Halle, 1902. *In* Schwalbes Ibr. N. F. Ed. 8, III, Abt., S. 446, 1903.

Mykytowycz, R. e Goodrich, B. S.: Skin glands as organs of communication in mammals. *J. Invest. Dermatol., 62:* 124, 1974.

Nadler, N. J., Young, B, A., Leblond, C. P. e Mitmaker, B.: Elaboration of thyroglobulin in the thyroid follicle. *Endocrinology, 74:* 333, 1964.

Nicolaides, N.: Human skin surface lipids-origin, composition and possible function. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 167. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Nicolaides, N.: Skin lipids. II. Lipid class composition of samples from various species and anatomical sites. *J. Am. Oil Chem. Soc., 42:* 691, 1965.

Nicolaides, N. e Foster J., R. C : Esters in human hair fat. *J. Am. Oil Chem. Soc., 33:* 404, 1956.

Nicolaides, N. e Rothman, S.: The site of sterol and squalene synthesis in the human skin. *J. Invest. Dermatol., 24:* 125, 1955.

Nicolaides, N. e Wells, G. C.: On the biogenesis of the free fatty acids in human skin surface fat. *J. Invest. Dermatol., 29:* 423, 1957.

Nicolaides, N , Fu, H. C. e Rice, G. R.: The skin surface lipids of man compared with those of eighteen species of animals. *J. Invest. Dermatol., 51:* 83, 1968.

Nicolaides, N., Reiss, O. K. e Langdon, R. G.: Studies of the *in vitro* lipid metabolism of the human skin. I. Biosynthesis in scalp skin. *J. Am. Chem. Soc., 77:* 1535, 1955.

Niebauer, G., Krawczyk, W. S., Kidd, R. 1. e Wilgram, G. F.: Staining of lipid in keratinosomes. *J. Invest. Dermatol., 52:* 367, 1969.

Nikkari, T.: Composition and secretion of the skin surface lipids of the rat; effects of dietary lipids and hormones. *Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17* (suppl. 85): 1, 1965.

Noble, R. L. e Collip, J. B.: Augmentation of pituitary corticotrophic extracts and its effect on the adrenals, thymus and preputial glands of the rat. *Endocrinology, 29:* 934, 1941 a.

Noble, R. L. e Collip, J. B.: A possible direct control of preputial glands of the female rat by the pituitary glands and indirect effects produced through the adrenals and gonads by augmented pituitary extracts. *Endocrinology, 29:* 943, 1941 b.

Novikoff, A. B.: Lysosomes and related particles. *In* The cell, vol. II, p. 423. Edit. por J. Brachet e A. E. Mirsky, Academic Press, New York, 1961.

Novikoff, A. B. e Holtzman, E.: Cells and organelles. Edit. por Holt, Rinehart e Winston, Inc., New York, 1970.

Novikoff, A. B. e Shin, W. Y.: The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relation to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J. Microscopie, 3:* 187, 1964.

Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Quintana, N. e Hauw, J.-J.: Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol., 50:* 859, 1971.

Odland, G. F. e Reed, T. H.: Epidermis. *In* Ultrastructure of normal and abnormal skin, p. 54. Edit. por A. S. Zelickson, Lea e Febiger, Philadelphia, 1967.

Oertel, G. W. e Treiber, L.: Metabolism and excretion of C_{19} and C_{18}-steroids by human skin. *Eur. J. Biochem., 7:* 234, 1969.

Oppel, A.: Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie, Glandulae inguinales, Vol. IV-V, p. 251. Edit. por Fischer, Jena, 1904.

Orsulak, P. J. e Gawienowski, A. M.: Olfactory preferences for the rat preputial gland. *Biol. Reprod., 6:* 219, 1972.

Otto, H. F.: The interepithelial lymphocytes of the intestinum. Morphological observations and immunologic aspects of intestinal enteropathy. *In* Current topics in Pathology, Vol. LVII, p. 81. Edit. por E. Grundmann e W. H. Kirsten, Springer-Verlag, Berlin, 1973.

Ozawa, H.: The fine structure of preputial glands in mice. *Acta Anat. Nipponica, 42:* 181, 1967.

Palay, S. L.: Morphology of secretion. *In* Frontiers of Cytology, p. 305. Edit. por Yale University Press, New Haven, 1958.

Pannese, E.: Osservazioni morfologiche e istochemiche sulle ghiandole prepuziale del ratto. *Arch. Ital. Anat. Embriol., 59:* 57, 1954.

Parakkal, P. F. e Matoltsy, A. G.: A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 20:* 85, 1964.

Parkes, A. S. e Bruce, H. M.: Olfactory stimuli in mammalian reproduction. *Science, 134:* 1049, 1961.

Passow, H., Rothstein, A. e Clarkson, T. W.: The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev., 13:* 185, 1961.

Patterson, J. F., Cheney, M. e Fishman, W. H.: Preputial gland beta-glucuronidase response to testosterone and to two anabolic steroids. *Endocrinology, 75:* 273, 1964.

Pearse, A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied, 2.ª edição. Edit. por J. e A. Churchill, Ltd., London, 1960.

Peracchia, C.: A system of parallel septa in crayfish nerve fibers. *J. Cell Biol., 44:* 125, 1970.

Peracchia, C. e Mittler, B. S.: Fixation by means of glutaraldehyde--hydrogen peroxide reaction products. *J. Cell Biol., 53:* 234, 1972.

Peter, G., Schröpc, F., Lippross, R. e Weiss, G.: Gaschromatograpische Untersuchungen der Talgdrüsenlipide. I. Bestimmung der Gesamtlipide. *Arch. Klin. Exp. Dermatol., 239:* 12, 1970.

Plewig, G., Christophers, E. e Braun-Falco, O.: Proliferative cells in the human sebaceous gland. *Acta Dermato-Venereol.,* (Stockh), *51:* 413, 1971.

Prottey, C., Hartop, P. J. e Ferguson, T. F. M.: Lipid synthesis in rat skin. *Br. J. Dermatol., 87:* 586, 1972.

Pugh, D. e Walker, P. G.: Histochemical localization of β-glucuronidase and N-acetyl-β-glucosaminidase. *J. Histochem. Cytochem., 9:* 105, 1961.

Rambourg, A.: An improved silver methenamine technique for the detection of periodic acid-reactive complex carbohydrates with the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem., 15:* 409, 1967.

Reinertson, R. P. e Wheatley, V. R.: Studies on the composition of human epidermal lipids. *J. Invest. Dermatol., 32:* 49, 1959.

Reisner, R. M. e Puhvel, M.: Lipolytic activity of *Staphylococcus albus*. *J. Invest. Dermatol., 53:* 1, 1969.

Reisner, R. M., Silver, D. Z., Puhvel, S. M. e Sternberg, T. H.: Lypolytic activity of *Corynebacterium acnes*. *J. Invest. Dermatol., 51:* 190, 1968.

Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high *pH* as an electron-opaque stain in electronmicroscopie. *J. Cell Biol., 17:* 208, 1963.

Richardson, G. S. e Axelrod, L. R.: Metabolism of labeled testosterone by minces and nuclei of preputial glands of male rats. *Endocrinology, 88:* 890, 1971.

Richardson, K. C., Jarett, L. e Finke, E. H.: Embedding in epoxi resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol., 35:* 313, 1960.

Riemersma, J. C.: Osmium tetroxide fixation of lipids: nature of the reaction products. *J. Histochem. Cytochem., 11:* 436, 1963.

Riemersma, J. C. e Booij, H. L.: The reaction of osmium tetroxide with lecithin: application of staining procedures. *J. Histochem. Cytochem., 10:* 89, 1962.

Robinson, D. e Stirling, J. L.: N-acetyl-β-glucosaminidases in human spleen. *Biochem. J., 107:* 321, 1968.

Rogers, G. E.: Electron microscope observations on the structure of sebaceous glands. *Exp. Cell Res., 13:* 517, 1957.

Rongone, E. L.: *In vitro* metabolism of testosterone by human male mammary skin. *Fed. Proc., 25:* 282, 1966 a.

Bongone, E. L.: Testosterone metabolism by human male mammary skin *Steroids, 7:* 489, 1966 b.

Rony, H. R. e Zakon, S. J.: Effect of androgens on the sebaceous glands of human skin. *Arch. Dermatol. Syph., 48:* 601, 1943.

Roth, S. I.: Hair and nail. *In* Ultrastructure of normal and abnormal skin, p. 105. Edit. por A. S. Zelickson, Lea e Febiger, Philadelphia, 1967.

Rowden, G.: Aryl sulfatase in the sebaceous glands of mouse skin. A combined electron microscope and cytochemical study. *J. Invest. Dermatol., 51:* 41, 1968.

Sagebiel, R. W. e Reed, T. H.: Serial reconstruction of the characteristic granule of the Langerhans cell. *J. Cell Biol., 36:* 595, 1968.

Sansone, G.: Metabolism of glycerol ethers and wax esters in the preputial gland of the mouse. Ph. D. Dissertation, Tulane University, New Orleans, 1968.

Sansone, G. e Reisner, R. M.: Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin — a possible pathogenic factor in acne. *J. Invest. Dermatol., 56:* 366, 1971.

Sansone-Bazzano, G., Reisner, R. M. e Bazzano, G.: A possible mechanism of action of estrogen at the cellular level in a model sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol., 59:* 299, 1972.

Schaffer, J.: Die Vorhautdrüsen von Maus und Ratte. *Ztschr. Mikr. Anat. Forsch., 34:* 1, 1933.

Schaffer, J.: Die Hautdrüsenorgane der Säugetiere, mit besonderer Berücksichtigung ihres histologischen Aufbaues und Bernerkungen über die Proktodäaldrüsen. Edit. por Urban e Schwarzenberg, Berlin, 1940.

Scheiman, L. G., Knox, G. D., Sher, D. e Rothman, S.: The role of bacteria in the formation of free fatty acids on the human skin surface. *J. Invest. Dermatol., 34:* 171, 1960.

Serri, F. e Huber, W. M.: The development of sebaceous glands in man. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 1. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Sheridan, M. N. e Belt, W. D.: Fine structure of the guinea pig adrenal cortex. *Anat. Rec., 149:* 73, 1964.

Sherins, R. J. e Bardin, W.: Preputial gland growth and protein synthesis in the androgen-insensitive male pseudohermaphroditic rat. *Endocrinology, 89:* 835, 1971.

Shettles, L. B., Disch, Z. e Osnos, M.: Neutral mucopolysaccharide of the human cervical mucus. *J. Biol. Chem., 192:* 589, 1951.

Shikita, M., Kakizaki, H. e Tamaoki, B.: The pathway of formation of testosterone from 3 β-hydroxypregn-5-en-20-one by rat testicular microsomes. *Steroids, 4:* 521, 1964.

Shikita, M. e Tamaoki, B.: Testosterone formation by subcellular particles of rat testes. *Endocrinology, 76:* 563, 1965.

Smith Jr., J. G.: The aged human sebaceous gland: effects of hormone administration and comparison with adolescent gland function. *Arch. Dermatol., 80:* 663, 1959.

Sprinz, O.: Über die Glandula caudalis bei *Cavia cobaya. Dermatol. Wochenschr., 55:* 1371, 1912.

Squier, C. A.: The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradisch peroxidase. *J. Ultrastruct. Res., 43:* 160, 1973.

Stanley, A. J. e Powell, R. A.: Studies on the preputial gland of the white rat. *Proc. Acad. Sci., 5:* 28, 1941.

Stoeckenius, W.: An electron microscope study of myelin figures. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 5:* 491, 1959.

Storey, W. F. e Leblond, C. P.: Measurement of the rate of proliferation of epidermis and associated structures. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 53:* 537, 1951.

Strauss, J. S. e Kligman, A. M.: The effect of progesterone and progesterone-like compounds on the human sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol., 36*: 309, 1961.

Strauss, J. S. e Matoltsy, A. G.: Skin. *In* Histology, 3.ª edição, p. 477. Edit. por R. O. Greep e L. Weiss, McGraw-Hill Book Company, New York, 1973.

Strauss, J. S. e Mescon, H.: The chemical determination of specific lipases in comedones. *J. Invest. Dermatol., 33:* 191, 1959.

Strauss, J. S. e Pochi, P. E.: The hormonal control of human sebaceous glands. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands*, p. 220. Edit. por W. Montagna, R. A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Strauss, J. S., Kligman, A. M. e Pochi, P. E.: The effect of androgens and estrogens on human sebaceous glands. *J. Invest. Dermatol., 39:* 139, 1962.

Stuzmann, J.: Die alkzessorischen Geschlechtsdrüsen von *Mus decermanus* und ihre Eutwicklung. *Z. Naturw., 71:* 257, 1898.

Summerly, R. e Woodbury, S.: Lipid synthesis (^{14}C-acetate incorporation) in the isolated human sebaceous gland, the appendage-freed epidermis, the sebocyst (steatocystoma) and the wen (keratinous cyst of skin). *Br. J. Dermatol., 86:* 614, 1972.

Suzuki, H. e Kurosumi, K.: Lamellar granules and keratohyalin granules in the epidermal keratinocytes with special reference to their origin, fate and function. *J. Electron. Microsc., 21:* 285, 1972.

Suzuki, H., Kurosumi, K. e Miyata, C.: Electron microscopy of spherical keratohyalin granules. *J. Invest. Dermatol., 60:* 219, 1973.

Swift, H. e Hruban, Z.: Focal degradation as a biological process. *Fed. Proc., 23:* 1026, 1964.

Szego, S. M. e Seeler, B. J.: Hormone-induced activation of target--specific lysosomes: acute translocation to the nucleus after administration of gonadal hormones *in vivo*. *J. Endocrinol., 56:* 347, 1973.

Szego, C. M., Seeler, B. J., Steadman, R. A., Hill, D. F., Kimura, A. K. e Roberts, J. A.: The lysosomal membrane complex. Focal point of primary steroid hormone action. *Biochem. J., 123:* 523, 1971.

Szirmai, J. A. e van der Linde, P. C.: Effect of castration on endoplasmic reticulum of the seminal vesicle and other target epithelia in the rat. *J. Ultrastruct. Res., 12:* 380, 1965.

Takayasu, S. e Adachi, K.: Hormonal control of metabolism in hamster costovertebral glands. *J. Invest. Dermatol., 55:* 13, 1970.

Terao, K., Sakakibara, Y., Yamazaki, M. e Miyaki, K.: Annular nucleolus in the hepatocyte of chicken embryo induced by aflatoxin B1. *Exp. Cell Res., 66:* 81, 1971.

Tezuka, T. e Freedberg, I. M.: Epidermal structural proteins. I. Isolation and purification of keratohyalin granules of the newborn rat. *Biochim. Biophys. Acta, 261:* 402, 1972.

Thiéry, J. P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. *J. Microscopie, 6*: 987, 1967.

Thyberg, J. e Friberg, U.: Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res., 33:* 554, 1970.

Toner, P. G. e Ferguson, A.: Intraepithelial cells in the human intestinal mucosa. *J. Ultrastruct. Res., 34:* 329, 1971.

Toner, P. G., Carr, K. E. e Wyburn, G. M.: The digestive system — an ultrastructural atlas and review. Edit. por Butterworth e Co. (Publishers) Ltd., London, 1971.

Tsai, S., Ying, B. e Gaylor, J. L.: Testicular sterols. I. Incorporation of menalonate and acetate into sterols by testicular tissue from rats. *Arch. Biochem. Biophys., 105:* 329, 1964.

Ugel, A. R.: Studies on isolated aggregating oligoribonucleoproteins of the epidermis with histochemical and morphological characteristics of keratohyalin. *J. Cell Biol., 49:* 405, 1971.

Ugel, A. R. e Idler. W.: Further characterization of bovine keratohyalin. *J. Cell Biol., 52:* 453, 1972.

Voigt, W. e Hsia, S. L.: Further studies on testosterone 5 α-reductase of human skin. *J. Biol. Chem., 248:* 4280, 1973.

Wakabayashi, M., Toyomi, F., Hidenori, N., Nakamura, K. e Yoichi, S.: Some biological aspects on the preputial gland of the female rat. *Kobe J. Med. Sci., 12:* 71, 1966.

Walter, A.: Über die Hautdrüsen mit Lipoidsekretion bei Nagern. *Beitr. Pathol. Anat., 73:* 142, 1924.

Ward, R. J. e Moore, T.: 7-dehydrosterol in the sexual organs of the rat. *Biochem. J., 55:* 295, 1953.

Werbin, H. e Chaikoff, I. L.: Utilization of adrenal gland cholesterol for synthesis of cortisol by the intact normal and the ACTH — treated guinea pig. *Arch. Biochem. Biophys., 93:* 476, 1961.

Wheatley, V. R.: Sebum: its chemistry and biochemistry. *Am. Perfumer, 68:* 37, 1956.

Wheatley, V. R., Chow, D. C. e Keenan Jr., F. D.: Studies of the lipids of dog skin. II. Observations on the lipid metabolism of perfused surviving dog skin. *J. Invest. Dermatol., 36:* 237, 1961.

Wilkinson, D. I.: Esterified cholesterol in surface lipids: methods of isolation and fatty acid content. *J. Invest. Dermatol., 53:* 34, 1969.

Wilson, J. D.: Studies on the regulation of cholesterol synthesis in the skin and preputial gland of the rat. *In* Advances in Biology of Skin, Vol. IV, *The sebaceous glands,* p. 148. Edit. por W. Montagna, R: A. Ellis e A. F. Silver, The MacMillan Co., New York, 1963.

Wilson, J. D. e Walker, J. D.: The conversion of testosterone to 5 α-androstan-17 β-ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man. *J. Clin. Invest., 48:* 371, 1969.

Wolff, K. e Schreiner, E.: Differential enzymatic digestion of cytoplasmic components of keratinocytes: electron microscopic observations. *J. Ultrastruct. Res., 36:* 437, 1971.

Yip, S. Y. e Freinkel, R. K.: The direct effect of ACTH on the rat preputial gland. *J. Invest. Dermatol., 43:* 389, 1964.

Zelickson, A. S.: Melanocyte, melanin granule, and Langerhans cell. *In* Ultrastructure of normal and abnormal skin, p. 163. Edit. por A. S. Zelickson, Lea e Febiger, Philadelphia, 1967.

